



Facultad de Biología

Departamento de Fisiología

TESIS DOCTORAL

Dependencias tróficas y sinápticas del sistema oculomotor

Rosendo Miguel García Hernández

Sevilla, 2018



ÁNGEL M. PASTOR LORO, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

BEATRIZ BENÍTEZ TEMIÑO, Profesora Contratada Doctorada del Dpto. de Fisiología de la Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN:

Que D. Rosendo Miguel García Hernández, Licenciado en Biología por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su dirección y supervisión el trabajo titulado “Dependencias tróficas y sinápticas del sistema oculomotor”, considerando que reúne todas las condiciones necesarias para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Sevilla, 15 de Diciembre de 2017.

Fdo. Ángel M. Pastor Loro

Fdo. Beatriz Benítez Temiño

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Plasticidad del sistema nervioso central	3
1.1.1. Lesión como herramienta de estudio.....	3
1.1.2. Efectos derivados de la deaferentación en el sistema nervioso	4
1.1.3. Mecanismos de deaferentación	5
1.1.4. Plasticidad sináptica	7
1.1.4.1. Plasticidad homeostática	8
1.1.5. Regulación y reorganización de la plasticidad sináptica tras la lesión	9
1.1.6. Mecanismos de compensación	12
1.2. Factores neurotróficos y plasticidad neuronal	16
1.2.1. Neurotrofinas	18
1.2.2. Receptores de neurotrofinas.....	18
1.2.3. Efectos biológicos de las neurotrofinas: papel en procesos de plasticidad sináptica.....	20
1.3. Sistema oculomotor	22
1.3.1. Organización anatómica del sistema oculomotor.....	22
1.3.1.1. Musculatura extraocular.....	22
1.3.1.2. Núcleos oculomotores	25
1.4. Modelo experimental.....	27
1.4.1. Motoneuronas del recto medial del NMOC	27
1.4.1.1. Localización de las motoneuronas del recto medial	27
1.4.1.2. Fisiología de las motoneuronas del recto medial	28
1.4.2. Aferencias a las motoneuronas del recto medial.....	29
1.4.2.1. Neuronas internucleares del NMOE	29
1.4.2.2. Núcleo vestibular lateral	31
1.4.2.3. Otras aferencias	32
1.5. Movimientos oculares	33
1.5.1. Movimientos sacádicos	33
1.5.2. Fijaciones oculares.....	35
1.5.3. Reflejo vestíbulo-ocular	37
1.5.4. Reflejo optocinético	38

1.5.5. Movimientos de seguimiento.....	39
1.5.6. Movimientos de vergencia	40
2. OBJETIVOS.....	43
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1. Animales de experimentación.....	49
3.2. Preparación quirúrgica de los animales para el registro crónico extracelular	51
3.3. Registros extracelulares unitarios	54
3.4. Axotomía	59
3.5. Adquisición de datos electrofisiológicos	60
3.5.1. Análisis de los movimientos oculares espontáneos	61
3.5.2. Análisis de los movimientos oculares durante el reflejo vestibulo-ocular	61
3.5.3. Análisis de la actividad neuronal durante movimientos oculares espontáneos	62
3.5.4. Análisis de la actividad neuronal durante el reflejo vestibulo-ocular.....	63
3.5.5. Análisis cualitativo de la actividad neuronal durante movimientos oculares de vergencia	64
3.6. Técnicas de marcaje anterógrado para microscopia óptica	64
3.7. Inyección de rodamina en los rectos mediales	65
3.8. Perfusión intracardiaca y obtención de cortes cerebrales	65
3.9. Técnicas morfológicas	67
3.9.1. Técnicas morfológicas para microscopia óptica de campo claro	69
3.9.2. Técnicas inmunohistoquímicas para microscopía óptica confocal	70
3.10. Análisis de los datos morfológicos	73
3.10.1. Visualización y captura de imágenes.....	73
3.10.2. Análisis de imágenes	73
3.11. Western blot.....	75
3.12. Estadística.....	77
4. RESULTADOS	79
4.1. Aferencias a las motoneuronas del recto medial	81
4.1.1. Correlatos anatómicos.....	81
4.1.2. Disparo neuronal de las aferencias a la subdivisión recto medial	84
4.2. Movimientos oculares tras la axotomía	87

4.2.1. Movimientos oculares espontáneos	87
4.2.2. Movimientos oculares espontáneos: Análisis	89
4.2.3. Movimientos oculares durante el reflejo vestibulo-ocular.....	93
4.2.4. Movimientos oculares durante el reflejo vestibulo-ocular: Análisis.....	95
4.3. Efectos de la deaferentación selectiva sobre el patrón de disparo de las motoneuronas del recto medial.....	97
4.3.1. Aspectos cualitativos del patrón de disparo de las motoneuronas del recto medial durante movimientos oculares espontáneos.....	97
4.3.2. Análisis de las propiedades de disparo durante fijaciones oculares.....	98
4.3.3. Análisis de las propiedades de disparo durante movimientos sacádicos	101
4.3.4. Aspectos cualitativos del patrón de disparo de las motoneuronas del recto medial durante estimulación vestibular	103
4.3.5. Análisis de las propiedades de disparo durante estimulación vestibular	105
4.3.6. Aspectos cualitativos del patrón de disparo de las motoneuronas del recto medial durante movimientos de vergencia.....	108
4.4. Alteraciones sinaptológicas en las motoneuronas del recto medial tras la deaferentación selectiva	110
4.5. La sección selectiva del TAD o del FLM provoca un aumento en la presencia de la proteína de crecimiento axonal GAP-43	115
4.6. Cambios en la presencia de neurotrofinas en las motoneuronas del recto medial en respuesta a la sección unilateral del TAD o del FLM.....	117
4.7. Evolución temporal de los cambios sinaptológicos tras la deaferentación selectiva de las motoneuronas del recto medial	120
4.8. Distribución de neurotrofinas en el sistema oculomotor de la rata.....	126
4.8.1. Patrón de distribución de neurotrofinas en las motoneuronas del sistema oculomotor de la rata adulta.....	128
4.8.2. Patrón de distribución de neurotrofinas en motoneuronas de otros núcleos del tronco del encéfalo.....	128
4.8.3. Análisis cuantitativo de la densidad óptica de neurotrofinas	131
4.8.4. Presencia de neurotrofinas en los músculos craneales	133
5. DISCUSIÓN.....	137
5.1. Correlatos anatómicos	140
5.2. Efectos a corto plazo en los movimientos oculares y las propiedades de disparo tras la deaferentación selectiva de las motoneuronas del recto medial.....	141

5.3. Efectos a largo plazo en el comportamiento ocular y el disparo tras la deaferentación selectiva de las motoneuronas del recto medial.....	145
5.4. Cambios en la sinaptología aferente tras la sección unilateral del TAD o del FLM	147
5.5. Posibles mecanismos moleculares en la reinervación de las motoneuronas del recto medial tras la deaferentación selectiva	149
5.6. Distribución trófica en sistemas motores craneales	154
5.6.1. Presencia de BDNF en las motoneuronas del sistema oculomotor y facial y de NT-3 solo en las motoneuronas oculomotoras	156
5.6.2. El NGF está presente en el neuropilo de los núcleos motores troncoencefálicos	159
5.6.3. Influencia trófica en la resistencia a la neurodegeneración durante la ELA de las motoneuronas extraoculares	160
6. CONCLUSIONES.....	163
7. BIBLIOGRAFÍA.....	167

ABREVIATURAS

ABC: Complejo avidina-biotina peroxidasa

ANOVA: Test de análisis de la varianza

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BSA: Albúmina sérica bovina

CGRP: Neuropeptido relacionado con el gen de la calcitonina

ChAT: Acetilcolina transferasa

Cy5: Indodicarbocianina

DAB: Diaminobencidina

EEM: Error estándar de la media

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

F₀: Frecuencia de disparo con la mirada en el centro de la órbita (a cero grados)

FD: Frecuencia de disparo

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FLM: Fascículo longitudinal medial

FRPB: Formación reticular ponto-bulbar

FRPP: Formación reticular pontina paramediana

GAP-43: Proteína asociada al crecimiento axonal de 43 kDa

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HRP: Peroxidasa de rábano

i.m.: Intramuscular

i.p.: Intraperitoneal

IgG: Inmunoglobulina G

k_s: Sensibilidad neuronal a la posición ocular durante movimientos espontáneos

k_v: Sensibilidad neuronal a la posición ocular durante estimulación vestibular

MIF: Fibras de innervación múltiple

NBE: Neurona de brote excitador

NBI: Neurona de brote inhibitorio

NDS: Suero de burro

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NMOC: Núcleo motor ocular común

NMOE: Núcleo motor ocular externo

NMOT: Núcleo motor ocular troclear

NT-3: Neurotrofina 3

NT-4/5: Neurotrofina 4/5

NVL: Núcleo vestibular lateral

NVM: Núcleo vestibular medial

NVS: Núcleo vestibular superior

PO: Posición ocular

pa/s: Potenciales de acción por segundo

PB: Tampón fosfato

PBS: Tampón fosfato salino

PBS-T: PBS con tritón

r_s: Sensibilidad neuronal a la velocidad ocular durante movimientos espontáneos

r_v: Sensibilidad neuronal a la velocidad ocular durante estimulación vestibular

SIF: Fibras de innervación única

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

TAD: Tracto ascendente de Deiters

TB: Tampón Tris-Cl

TBS: Tampón Tris-Cl salino

TRITC: Tetrametil rodamina 5,6 isotiocianato

Trk: Tropomiosina quinasa

VO: Velocidad ocular

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

RESUMEN

Las motoneuronas del recto medial presentes en el núcleo motor ocular común (NMOC) reciben dos entradas pontinas principales: las neuronas internucleares del núcleo motor ocular externo (NMOE), cuyos axones discurren por el fascículo longitudinal medial (FLM), y las neuronas del núcleo vestibular lateral (NVL), cuyos axones proyectan a través del tracto ascendente de Deiters (TAD). Las neuronas internucleares del NMOE son responsables de la conjugación de la mirada en el plano horizontal, mientras que el NVL provee a las motoneuronas del recto medial con señal de velocidad de la cabeza. En el presente proyecto se ha estudiado el efecto de la pérdida selectiva de aferencias sobre los movimientos oculares y las propiedades de disparo de las motoneuronas que inervan al recto medial en el gato adulto. Así, se realizaron registros extracelulares de las neuronas motoras tras la sección unilateral del FLM o del TAD, y se hicieron análisis comparativos de sus propiedades de disparo. A corto plazo, ambas lesiones produjeron efectos similares, con cambios más severos tras la sección del FLM, apuntando a un rol más relevante de este fascículo sobre el disparo de las motoneuronas del recto medial. A largo plazo tras la lesión, los registros electrofisiológicos revelaron diferencias entre ambas lesiones. Así, los efectos de la sección del FLM fueron permanentes, mientras que los animales con el TAD seccionado mostraron una recuperación completa de los parámetros analizados, lo que permitió postular mecanismos de compensación que se desencadenarían tras la sección del TAD. En línea con esta hipótesis, estudios morfológicos mostraron que 2 meses tras la lesión del TAD, hubo un incremento en la cobertura sináptica somática de las motoneuronas en comparación con los datos obtenidos a corto plazo. Por otra parte, un análisis del curso temporal a corto plazo de los terminales sinápticos tras la deaferentación selectiva en la rata adulta, reveló que tras la sección del TAD se produjo una bajada en la cobertura sináptica somática 48 horas tras la lesión, que se recuperó 48 horas después, en concordancia con los resultados obtenidos en el gato y mostrando una reinervación compensatoria tras la eliminación de la entrada vestibular, que no se observó tras la eliminación de la proyección procedente del NMOE. Estos ajustes plásticos pudieron estar mediados por neurotrofinas, cuya presencia aumentó a corto plazo en el soma de las motoneuronas deaferentadas, pudiendo regular así la expresión de ciertas proteínas de crecimiento axonal, como la proteína asociada al crecimiento axonal de 43 kDa (GAP-43), que también se vio incrementada a corto plazo.

De los resultados obtenidos se concluye que las motoneuronas oculomotoras deaferentadas mantienen una dependencia con los factores neurotróficos. Finalmente, se caracterizó mediante inmunocitoquímica y Western blot la presencia de neurotrofinas en el sistema motor ocular, resistente a la degeneración motoneuronal mediada por la esclerosis

lateral amiotrófica (ELA), comparándolo con otros sistemas motores craneales, que sufren neurodegeneración. Se demostró una mayor presencia de neurotrofinas tanto en los músculos como en los núcleos del sistema oculomotor, en comparación con los sistemas facial y lingual. Por tanto, se concluye que diferencias en el aporte trófico entre el sistema oculomotor y otros sistemas motores craneales están relacionadas con la particular resistencia de las motoneuronas extraoculares a la neurodegeneración.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Plasticidad del sistema nervioso central

La plasticidad puede ser definida como la habilidad del sistema nervioso de adaptarse modificando su estructura y función en respuesta a perturbaciones externas o internas (Sharma y col., 2013; Westlake y Byl, 2013). Es bien conocido que la capacidad plástica del sistema nervioso central (SNC) es mayor en estadios tempranos del desarrollo (Nys y col., 2015, Qiao y col., 2016). Sin embargo, la facultad de modificar funcional y estructuralmente las conexiones entre las células nerviosas se conserva a lo largo de la vida, de modo que el SNC funciona en un estado de plasticidad continua (Pascual-Leone y col., 2005).

En el sistema nervioso, el término plasticidad se aplica a una gran cantidad de fenómenos como la neurogénesis, la recuperación funcional o la reorganización de circuitos neuronales. Estos procesos suponen una alteración de la respuesta neuronal. Sin embargo, para que se considere la existencia de plasticidad neuronal debe producirse un cambio persistente en las propiedades funcionales, así como modificaciones en la organización de los circuitos neuronales (Calford, 2002; Sharma y col., 2013; Westlake y Byl, 2013).

1.1.1. Lesión como herramienta de estudio

La plasticidad neuronal subyace a los procesos de aprendizaje y memoria, pero también forma parte de la respuesta neuronal a la lesión. Así, la lesión física o química ha sido empleada en numerosas ocasiones como inductora de los procesos plásticos en el SNC. Por ejemplo, la desconexión entre las células pre- y postsinápticas produce efectos diferentes en el SNC y en el sistema nervioso periférico (SNP, Fu y Gordon, 1997). Solo tras la sección de axones de neuronas del SNP, las fibras seccionadas regeneran, formando conos de crecimiento, a partir de los cuales los axones volverán a crecer y ocupar los sitios denervados, restableciendo, al menos en parte, la función previa a la lesión (Scheib y Höke, 2013; Webber y col., 2008). Así, el extremo proximal pasa de un fenotipo adulto a uno regenerativo, y, una vez restablecido el contacto, de nuevo al estado funcional adulto (Navarro y col., 2007). Sin embargo, en el SNC, los axones seccionados encuentran un medio no permisivo para la regeneración axonal, lo que conlleva alteraciones permanentes de las neuronas lesionadas y en algunos casos la muerte celular. Por lo tanto, en el SNC, son otros mecanismos de reinervación local los que permiten la ocupación de los espacios sinápticos vacantes tras la lesión (Raisman, 1977).

Así, tras un daño en el SNC podemos distinguir diferentes grupos neuronales según su participación en los procesos activos de degeneración y reorganización que siguen a la lesión: i. Las neuronas axotomizadas; ii. Las células que pierden sus aferencias al degenerar los cabos distales de los axones seccionados; iii. Las células que pierden su diana, al morir o atrofiarse las neuronas lesionadas; y iv. Las células que no se afectan directamente por la lesión, pero que pueden modificar su estructura y/o función de forma indirecta (Deller y Frotscher, 1997).

Por consiguiente, otra manipulación que permite estudiar la reorganización funcional y estructural del SNC adulto es la lesión mecánica o el bloqueo funcional de la conectividad aferente. Sin embargo, no se conoce en profundidad el papel que tiene la conectividad, composición y actividad sináptica aferente en el mantenimiento de las propiedades fisiológicas y morfológicas de las neuronas, así como la respuesta y mecanismos de plasticidad que exhiben cuando estos parámetros se modifican. El presente trabajo se centra en los efectos de la deaferentación de neuronas centrales adultas en las propiedades electrofisiológicas y en la estructura de los circuitos neuronales.

1.1.2. Efectos derivados de la deaferentación en el sistema nervioso

Tras la sección o eliminación de un tracto axonal, las neuronas diana de los axones lesionados pierden algunas de sus entradas. Esta pérdida de aferencias sobre la neurona postsináptica se conoce como deaferentación. La deaferentación puede producir alteraciones de las propiedades funcionales y morfológicas de la neurona afectada.

Así, la deaferentación puede desembocar en modificaciones funcionales, como cambios en las propiedades de disparo (Degos y col., 2013; Francis y Manis, 2000; Reeves y Steward, 1988), en la excitabilidad neuronal (Desai y col., 1999; Gage y col., 1983c; Him y Dutia, 2001; Shao y col., 2009), en la composición y densidad de receptores en la membrana (Shao y col., 2009; Smith y Zheng, 2013) o en la expresión de determinadas proteínas (García y col., 2000; Krügel y col., 2001; Park y col., 2013). Es destacable la relación existente entre cambios en la expresión de factores tróficos (DeCouto y col., 2003; Gómez-Pinilla y col., 2004; Grosheva y col., 2016; Johnson y col., 2000; Qin y col., 2006; Stowe y col., 2007; Widenfalk y col., 2001) y/o de sus receptores (Keast y Kepper, 2001; Widenfalk y col., 2001) y la retirada de aferencias a la neurona postsináptica a nivel del SNC y SNP, señalando el importante papel que estas moléculas ejercen en los cambios en la conectividad sináptica tras procesos de deaferentación.

Por otro lado, se ha observado que tras la deaferentación parcial se pueden desencadenar modificaciones estructurales como la expansión o retracción del árbol dendrítico

de la neurona postsináptica (Marik y col., 2010; Wang y Rubel, 2012), cambios en la morfología de dendritas o espinas dendríticas (Caceres y Steward, 1983; Nitsch y Frotscher, 1993; Sorensen y Rubel, 2006) e incluso puede producirse degeneración transneuronal y atrofia o muerte de la neurona postsináptica, especialmente durante estadios postnatales (Harris y col., 2008; Poduri y col., 1995). Además, tras procesos de deaferentación, se puede producir el crecimiento de brotes que emergen de axones intactos y que establecen nuevas sinapsis para ocupar el espacio vacante sobre la membrana de la neurona denervada (Cotman y col., 1981; Mendell, 1984). Este remodelado de las conexiones sinápticas es una propiedad fundamental de las neuronas, que puede conllevar amplios cambios en la organización del cerebro que faciliten mecanismos compensatorios a nivel morfológico y/o funcional tras lesiones o enfermedades neurodegenerativas (Butz y col., 2009; Citri y Malenka, 2008; Deller y Frotscher, 1997; Jamann y col., 2017; Nys y col., 2015; Westlake y Byl, 2013).

1.1.3. Mecanismos de deaferentación

Existen diversas manipulaciones para estudiar los procesos que subyacen a la deaferentación y la posterior remodelación sináptica en el sistema nervioso. Así, podemos distinguir entre deaferentación mecánica, química e inducida por lesión.

La deaferentación mecánica consiste en la desconexión directa por axotomía de las aferencias. Es una de las formas de deaferentación más clásicamente usadas. Así, en la bibliografía actual se pueden encontrar numerosos estudios sobre denervación directa a nivel de corteza cerebral (Calford, 2002; Graziano y Jones, 2009; Nys y col., 2015; Newton y col., 2002), hipocampo (Frotscher y col., 1997; Gage y col., 1983a, b; Krügel y col., 2001) o médula espinal (Darian-Smith y col., 2013; Filli y Schwab, 2015; Zhang y col., 1995), entre otras zonas del SNC.

La desconexión mecánica entre una célula y la fibra que la inerva supone, además de la deaferentación de la neurona de interés, un traumatismo en el sistema nervioso, lo que desencadena una respuesta compleja, que en muchos casos implica procesos de degeneración y regeneración tras la lesión, los cuales son independientes de la respuesta a la deaferentación.

Existe otro tipo de deaferentación que resulta útil para estudiar los efectos directos de la inactividad sináptica sobre el disparo, la morfología y el fenotipo de la neurona postsináptica: la deaferentación química. Un ejemplo de deaferentación química es la utilización de toxina tetánica (González-Forero y col., 2005; Jiang y col., 1998), que se transporta transinápticamente desde la unión neuromuscular hasta los terminales aferentes a la motoneurona, donde bloquea la transmisión sináptica (Rind y col., 2005). Así, la inyección de toxina tetánica en el recto lateral

produce cambios reversibles en el patrón de disparo de las motoneuronas del núcleo motor ocular externo (NMOE) que dependen de la dosis: A dosis baja de toxina tetánica se bloquean exclusivamente los terminales aferentes inhibitorios, lo que desencadena un incremento en el patrón de disparo, mientras que a dosis más altas se produce un bloqueo de aferencias inhibitorias y excitadoras, produciendo una deaferentación completa de las motoneuronas abductoras, lo que conlleva un patrón de disparo monotónico y de bajas frecuencias (González-Forero y col., 2002, 2003), acompañado de cambios estructurales en la organización sináptica de dichas células (González-Forero y col., 2004). Otra molécula capaz de producir deaferentación química es la β -bungarotoxina, abundante en el veneno de las serpientes del género *Bungarus*, que bloquea la liberación de neurotransmisor en los terminales presinápticos. Así, inyecciones de β -bungarotoxina en la cóclea de ratas adultas causa muerte celular en las neuronas del ganglio ciliar sin verse daños sobre las células ciliadas ni en otras células del oído interno (Martínez-Monedero y col., 2006; Palmgren y col., 2010). La tetrodotoxina, una toxina de origen marino que bloquea canales de sodio, es otra sustancia comúnmente utilizada en los experimentos de deaferentación química, especialmente a nivel de la corteza somatosensorial (Frenkel y Bear, 2004; Harris y col., 2008).

Finalmente, podemos hablar de la deaferentación inducida por pérdida de contacto eferente o deaferentación indirecta. La axotomía de una neurona en el SNC representa un método lesivo, que induce denervación y remodelación sináptica sobre la neurona lesionada. Los efectos producidos por este tipo de deaferentación son difíciles de estudiar, pues no es posible separar las consecuencias producidas por la deaferentación, la denervación eferente y las causadas por la lesión en sí. Se conoce que la axotomía produce la retirada de aferencias sobre la neurona lesionada debido a la pérdida del contacto con su diana, tanto a nivel del SNP como del SNC (Brännström y Kellerth, 1998; Delgado-García y col., 1988; Pastor y col., 2000). Existen evidencias morfológicas que sugieren que la deaferentación post-axotomía ocurre fundamentalmente en el soma y las dendritas proximales, y que la reducción en el número de contactos sinápticos podría afectar de manera diferente dependiendo de la naturaleza de los terminales presinápticos (Brännström y Kellerth, 1998; Delgado-García y col., 1988; Sumner, 1975). El presente trabajo se centra en el estudio del efecto de la deaferentación directa.

1.1.4. Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica es la capacidad del sistema nervioso de modificar la efectividad o fuerza de una determinada sinapsis, así como de cambiar su número y las características intrínsecas de una o un grupo de células a lo largo de la red neuronal (Calford, 2002; Citri y Malenka, 2008; Holtmaat y Svoboda, 2009; Tsukahara, 1981). La plasticidad sináptica parece ser uno de los principales mecanismos que permite a los organismos aprender y adaptarse a las condiciones ambientales, capacidad que se retiene en el cerebro adulto incluso en condiciones patológicas (Guo y col., 2015; He y col., 2009; van Meer y col., 2012). La plasticidad inducida por lesión ha sido descrita en diferentes especies, prestando especial interés a la comprensión de los mecanismos que la generan y regulan. Se pueden distinguir dos tipos de plasticidad sináptica, funcional y estructural (Butz y col., 2009; Jamann y col., 2017).

La plasticidad sináptica funcional abarca todos los mecanismos que modifican la efectividad de una sinapsis, como cambios en la configuración de receptores postsinápticos (Bentea y col., 2017; Kilman y col., 2002; MacGillavry y col., 2013), en la liberación de neurotransmisor por parte del terminal presináptico (Kaneko y col., 2017; Matz y col., 2010), en la excitabilidad de membrana (Munson y col., 1997; Wefelmeyer y col., 2015); así como cambios en el balance de excitación e inhibición (Marik y col., 2010).

Por el contrario, cualquier cambio en la conectividad neuronal se define como plasticidad estructural, y abarca un amplio abanico de alteraciones. Se pueden dar modificaciones estructurales en las conexiones de un circuito neuronal mediante cambios en el número de sinapsis, ya sea eliminando sinapsis existentes (Bastrikova y col., 2008) u originando nuevas sinapsis (De Paola y col., 2006; Knott y col., 2002; Marik y col., 2010; Murphy y Corbett, 2009), proceso que se conoce como sinaptogénesis reactiva (Deller y Frotscher, 1997). También pueden deberse a cambios en el patrón de la conectividad sináptica (*synapse turnover*), que consisten en la retracción, modificación de la dirección y posterior contacto con un nuevo blanco de los terminales existentes (De Paola y col., 2006; Trachtenberg y col., 2002, Yamahachi y col., 2009). Además se pueden producir modificaciones en el patrón de ramificación dendrítica o axonal (Marik y col., 2010; Tailby y col., 2005; Schubert y col., 2013; Wang y Rubel, 2012), e incluso en determinados casos en el número de células (Altman y Das, 1965; Gould y Gross, 2002).

1.1.4.1. Plasticidad homeostática

Procesos lesivos a nivel del SNC, como la deaferentación, pueden producir alteraciones en las propiedades intrínsecas de los circuitos neuronales. Así por ejemplo, se puede desbalancear el equilibrio eléctrico entre excitación e inhibición, originando patrones de actividad neuronal que tienden a exceder los límites funcionales (Jamann y col., 2017; Turrigiano, 2012; Turrigiano y Nelson, 2004). Se ha comprobado que estos cambios en el equilibrio excitación-inhibición pueden conducir a una excitabilidad en exceso que perturba las respuestas de la red neuronal al completo.

La morfología y la fisiología sináptica están estrechamente relacionadas, y ambas pueden ser modificadas en función del uso de las sinapsis, en una forma dependiente de actividad (Katz y Shatz, 1996; Kilman y col., 2002; Walmsley y col., 1998). De aquí surge el concepto de plasticidad Hebbiana, que afirma que la actividad sináptica juega un papel en el mantenimiento, formación o eliminación de nuevas sinapsis. De esta forma, el uso repetido de una sinapsis tendería a estabilizarla así como incrementar su eficacia, mientras que el desuso de la misma desencadenaría su eliminación (Hebb, 1949). Sobre este concepto se basan los mecanismos dependientes de actividad de potenciación y depresión sináptica a largo plazo (Citri y Malenka, 2008; Massey y Bashir, 2007).

Sin embargo, la regla hebbiana de plasticidad podría desestabilizar la actividad y organización de los circuitos neuronales al completo. Así, cambios en la eficacia sináptica de los terminales presinápticos desencadenarán modificaciones en la efectividad postsináptica, y a su vez este cambio producirá más potenciación. Como resultado, las entradas que se correlacionan positivamente se potenciarían, mientras que las entradas que están correlacionadas negativamente se deprimirían, perdiéndose la selectividad de las redes neuronales (Jamann y col., 2017; Turrigiano, 2012; Turrigiano y Nelson, 2000, 2004). Existen por lo tanto mecanismos que tienden a compensar el desbalance de actividad, actuando sobre la eficacia sináptica total y la excitabilidad neuronal. Al conjunto de estos procesos se le ha denominado plasticidad homeostática (Davis y Bezprozvanny, 2001; Turrigiano, 2012). Se ha comprobado que la privación visual *in vitro* (Desai y col., 2002; Lambo y Turrigiano, 2013; Turrigiano y col., 1999) o *in vivo* (Keck y col., 2013) que conlleva la deaferentación de neuronas corticales, desencadena incrementos en los potenciales postsinápticos excitadores y en la excitabilidad de las células deaferentadas, relacionados con los procesos de plasticidad homeostática. Ambos procesos van acompañados de cambios en la densidad de receptores de glutamato en las membranas postsinápticas (Desai y col., 2002; Keck y col., 2013; Turrigiano, 1999), proceso que comparten

con los mecanismos de potenciación a largo plazo. Sin embargo, los procesos sinápticos de potenciación a largo plazo son rápidos y a nivel local, mientras que las variaciones en los potenciales postsinápticos excitadores ocurren a escala de tiempo y distancia mayores (Turrigiano y Nelson, 2004).

Recientemente ha surgido un modelo que intenta explicar el mecanismo de regulación homeostática (Davis y Bezprozvanny, 2001; Turrigiano, 2012). Este modelo sugiere que las células nerviosas son capaces de monitorizar mediante "sensores" ciertos parámetros de su actividad eléctrica, así como de la red neuronal de la que forman parte, manteniéndolos estables alrededor de determinados valores, de tal forma que la información recibida sería transmitida a vías intracelulares que finalmente actuarían sobre diferentes elementos de la membrana pre- y postsináptica, en cuyo proceso participarían señales moleculares de forma retrógrada y anterógrada, como factores neurotróficos, proteínas de membrana o neurotransmisores (Johnson y col., 2000; Novikov y col., 2000; Rutherford y col., 1997; Vlachos y col., 2013).

Por tanto, para entender el concepto de plasticidad hay que verlo como un fenómeno que se produce en el seno de dos componentes que pueden tener efectos diametralmente opuestos: un componente hebbiano, que se refiere a mecanismos basados en la modificación constante de las propiedades de los circuitos neuronales; y un componente homeostático, con mecanismos que promueven la estabilidad de las vías neuronales (Turrigiano, 2012; Turrigiano y Nelson, 2000, 2004). Estos sistemas operan en paralelo permitiendo cambios a nivel molecular, celular, de sistema y de comportamiento, además de cambios homeostáticos y compensatorios en el conjunto de la red neuronal (Nys y col., 2015).

1.1.5. Regulación y reorganización de la plasticidad sináptica tras la lesión

Tras una lesión en el SNC pueden diferenciarse dos mecanismos plásticos: las respuestas regenerativas del segmento proximal del axón dañado y la generación de nuevas colaterales axonales desde fibras nerviosas intactas (Frotscher y col., 1997).

La axotomía de una neurona en el SNC produce la degeneración retrógrada del extremo proximal del axón y la pérdida del extremo distal (Rossi y col., 1997). Las neuronas axotomizadas se atrofian o mueren, dependiendo de diferentes factores que influyen en su supervivencia. Así, la cercanía de la lesión al soma o la interrupción del flujo trófico con su diana, parecen ser factores relevantes para la supervivencia de estas células (Sofroniew e Isacson, 1988). Además, la interacción de las neuronas axotomizadas con células gliales también parece ser fundamental, ya que éstas intervienen en los procesos de degeneración tras la lesión, además de tener un

papel neuroprotector, pues evitan que se propague la inflamación tras la lesión (Thanos y Mey, 1995; Scheib y Höke, 2013).

El SNC posee una capacidad limitada de regeneración axonal (Rossi y col., 1997), opuesto a lo que sucede en el SNP, donde los axones lesionados tienen la capacidad de regenerar y contactar de nuevo con una diana (Scheib y Höke, 2013). En el SNC, en los alrededores de la lesión se producen respuestas abortivas de proliferación en el segmento proximal del axón lesionado (Filli y Schwab, 2015; Schnell y Schwab, 1993), sin que lleguen a restaurarse las conexiones ni la función previa a la lesión (Deller y Frotscher, 1997). La regeneración axonal, por tanto, es más efectiva en el SNP que en el SNC. Este hecho se ha comprobado en estudios donde se implantaron injertos de nervio periférico tras lesiones centrales, y se producía la regeneración de los axones lesionados a través del injerto (David y Aguayo, 1981; Hagg y col., 1990a), llegando a penetrar en el SNC hospedador y formar contactos sinápticos (Sauvé y col., 1995). Estas mismas respuestas, aunque menos amplias, se han visto cuando se implanta tejido embrionario (Benítez-Temiño y col., 2002) o bien células madres embrionarias (Morado-Díaz y col., 2014) en la zona de la lesión.

Otra de las respuestas más comunes tras la deaferentación en el SNC es la generación de colaterales axonales desde fibras no lesionadas. Se acepta que ciertas regiones del SNC adulto tienen la potencialidad de formar nuevas uniones sinápticas en respuesta a estímulos internos o externos. Así, se ha demostrado que tras la deaferentación de neuronas corticales (Sugihara y col., 2003; Yamahachi y col., 2009; Zhang y col., 2013) del hipocampo (Frotscher y col., 1997; Gage y col., 1983a; Steward y col., 1988), talámicas (Bromberg y col., 1987), cerebelosas (Aoki y Sugihara, 2012; Grasselli y Strata, 2013), del tronco del encéfalo (Jain y col., 2000) o medulares (Darian-Smith y col., 2013; Rosenzweig y col., 2010; Zhang y col., 1995) se generan nuevas colaterales axonales de aferentes ya existentes o de fibras locales próximas.

Estas respuestas parecen permitir la reinervación de las dianas deaferentadas, así como la restauración del número de sinapsis previo a la lesión. Entre los procesos descritos se incluye la formación de nuevas zonas activas a partir de sinapsis preexistentes (sinapsis múltiples), o bien la invasión de dendritas por nuevos terminales (Beier y col., 2017; Deller y col., 1995; Steward y col., 1988; Tropea y col., 2003), proceso denominado proliferación axonal terminal (Deller y Frotscher, 1997). La generación de colaterales es altamente selectiva en cuanto al lugar del sistema nervioso donde tiene lugar, y al tipo de fibras que exhiben dicho fenómeno: incluso dentro del mismo tipo neuronal, algunas fibras tienen la capacidad de generar colaterales y

otras no (Deller y Frotscher, 1997; Tsukahara, 1981). Además, el proceso de reinervación no es azaroso, y se lleva a cabo mediante mecanismos competitivos (Proctor y col., 1979).

La generación de colaterales axonales puede ser inducida por señales de diferente naturaleza. La aparición de espacios postsinápticos vacantes puede ser reconocida por las fibras supervivientes, que iniciarían el brote de nuevos terminales (Raisman, 1977). De este modo las células denervadas expanden sus campos receptores postsinápticos para maximizar el espacio sináptico disponible (Caceres y Steward, 1983; Nitsch y Frotscher, 1993). Otra señal que inicia la proliferación axonal terminal puede ser la pérdida en el balance entre las aferencias inhibitoras y excitadoras sobre una neurona (Deller y col., 1995; Marik y col., 2010; Zhang y col., 2013), e incluso la presencia de terminales lesionados degenerando también pueden inducir los procesos de regeneración axonal (Collyer y col., 2014; Ramer y col., 1997).

Por otra parte, la deaferentación puede producir cambios en la actividad sináptica alterando el fenotipo de las neuronas denervadas. Así, previamente se ha demostrado una relación entre la denervación aferente, la generación de nuevas fibras axonales y el aumento en la expresión de ciertas proteínas asociadas al crecimiento y la organización axonal, muy abundantes durante el desarrollo. Entre ellas destacan proteínas como la GAP-43, proteína asociada al crecimiento axonal de 43 kDa (Allegra Mascaro y col., 2013; Grasselli y col., 2011; Zhang y col., 2005), proteínas de adhesión celular como moléculas de adhesión neuronales (NCAMs; Dityatev y col., 2000; Jucker y col., 1995) o proteínas L1 (L1CAMs; Jucker y col., 1996; Zhang y col., 2005), así como factores de transcripción relacionados con la expresión de proteínas estructurales y de regeneración como c-Jun (Nangle y Keast, 2009; Pearson y col., 2003).

También se ha observado que la denervación produce cambios en la expresión de factores tróficos o en la densidad de sus receptores (Deller y Frotscher, 1997; Schinder y Poo, 2000), como se ha visto en experimentos *in vitro* e *in vivo* en neuronas de diferentes zonas del SNC como corteza (Desai y col., 1999; Stowe y col., 2005), hipocampo (Bramham y col., 1996; Zafra y col., 1991), cerebelo (Bessho y col., 1993) o médula espinal (Gomez-Pinilla y col., 2004; Johnson y col., 2000). Además, se ha demostrado la relación existente entre un aumento en la expresión de factores neurotróficos y la generación de nuevas colaterales axonales tras procesos lesivos (DeCouto y col., 2003; Hagg y col., 1990b; Jakeman y col., 1998; Koelsch y col., 2010; Koda y col., 2004; Scott y col., 2005; Schnell y col., 1994; Tropea y col., 2003; Zhou y col., 2009). Así, se ha comprobado que los factores tróficos estimulan la expresión de ciertos genes asociados al crecimiento y la regeneración (Gómez-Pinilla y col., 2004; Klöcker y col., 2001).

También, se ha puesto de manifiesto la relación entre los factores tróficos y ciertas proteínas de inhibición del crecimiento axonal. Así, los factores tróficos modulan la respuesta de los conos de crecimiento a dichas proteínas inhibitoras (Cai y col., 1999; Tuttle y O'Leary, 1998).

Una vez generadas las nuevas colaterales, la formación de contactos sinápticos con los terminales postsinápticos parece ser dependiente de numerosos factores a nivel local, tanto pre- como postsinápticos, los mismos que dirigen las conexiones neuronales durante el desarrollo (Goodman y Schatz, 1993; Sanes y Yamagata, 2009).

1.1.6. Mecanismos de compensación

La respuesta óptima por parte del SNC tras la lesión sería la restauración funcional original de las conexiones existentes mediante la regeneración del axón dañado (Figura 1A). Desafortunadamente, y como se ha visto anteriormente, esta respuesta no ocurre en el SNC adulto, donde principalmente se producen respuestas regenerativas abortivas (Figura 1B, I).

Una de las respuestas plásticas que destacan tras la lesión del SNC, o durante el transcurso de enfermedades neurodegenerativas, consiste en la generación de nuevas colaterales desde axones no lesionados. Estas nuevas colaterales aferentes pueden participar en mecanismos de compensación para la recuperación funcional y/o anatómica de la neurona denervada. El término compensación puede ser definido como el conjunto de procesos que tienen lugar para superar la pérdida o el déficit de aferencias sobre la neurona postsináptica mediante diferentes mecanismos neurales, que son necesarios tanto durante el desarrollo como en la etapa adulta, cambiando el funcionamiento de determinadas regiones del SNC tras la lesión (Møller, 2001).

También, tras la deaferentación, las colaterales emergentes desde aferencias no lesionadas podrían participar en la recuperación funcional (Figura 1B, II) de la célula deaferentada mediante la reinervación de la misma, originando lo que se conoce como mecanismos de compensación morfo-funcionales (Bachmann y col., 2014; Gage y col., 1983a, b; Rosenzweig y col., 2010; Rossi y col., 1991a, b). Este tipo de mecanismos de compensación para recuperar la funcionalidad previa a la lesión se han comprobado mediante estudios a lo largo de todo el SNC: en corteza (Bachmann y col., 2014), hipocampo (Gage y col., 1983a, b), cerebelo (Aoki y Sugihara, 2012), tronco del encéfalo (Tropea y col., 2003) o médula espinal (Darian-Smith y col., 2013; Mendell y col., 1978).

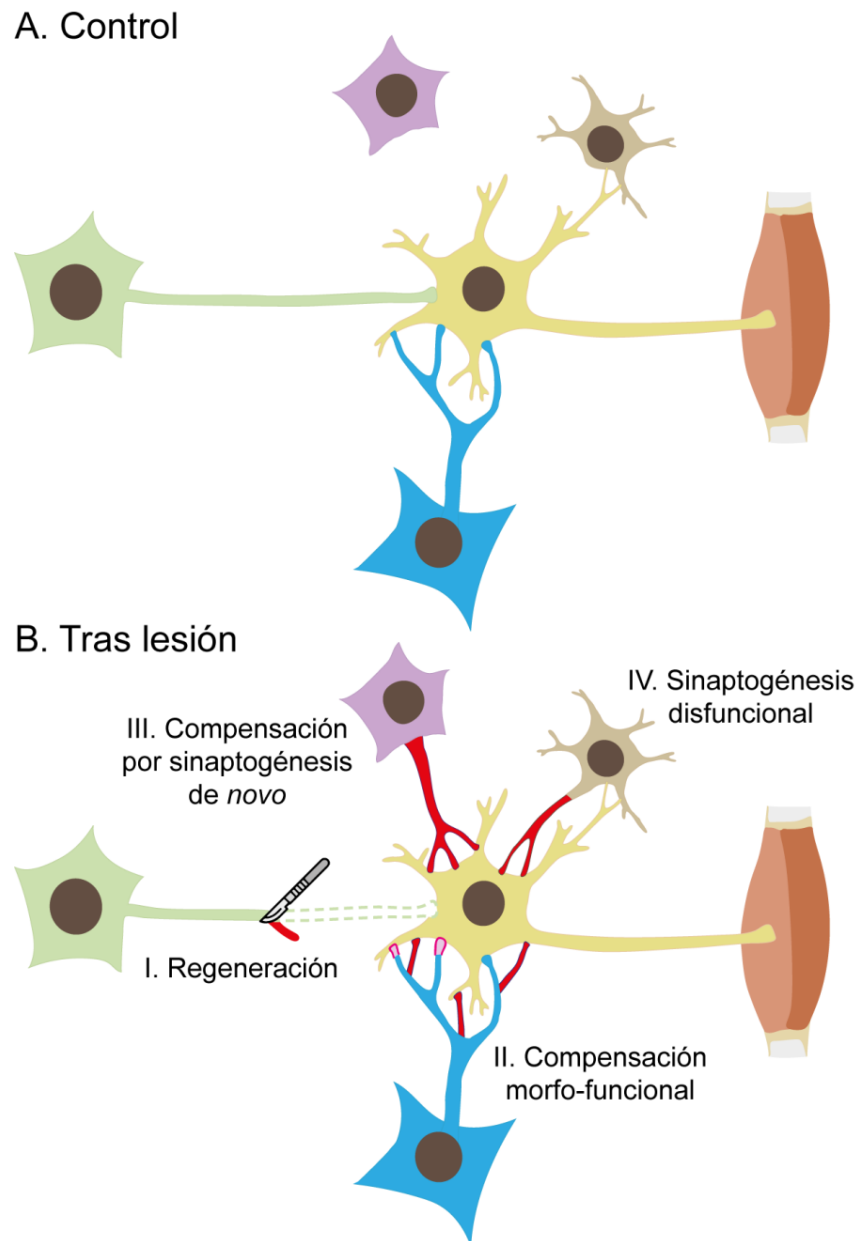


Figura 1. Mecanismos de compensación tras la deaferentación en el SNC. **A:** Representación de un hipotético circuito neuronal a nivel del SNC, donde se ilustran las aferencias (células verde y azul) a una motoneurona (amarilla) y su salida motora. **B:** Se representa el mismo circuito que en **A** pero tras una lesión. Las neuronas axotomizadas (célula verde) que sobreviven poseen una capacidad limitada de regenerar, produciendo en su mayoría respuestas regenerativas abortivas (**I**). A nivel de la población deaferentada se pueden producir diversas respuestas funcionales y estructurales para compensar la retirada de terminales aferentes. Así, las entradas sinápticas preexistentes pueden aumentar la efectividad sináptica, o bien generar nuevas colaterales que formen más sinapsis con la neurona deaferentada; se trata de mecanismos de compensación que tienden a recuperar la funcionalidad previa a la lesión (**II**). Además se pueden producir nuevos contactos aferentes desde neuronas (célula morada) que normalmente no están conectadas con la neurona deaferentada, sin recuperar la funcionalidad, pero sin afectar negativamente al sistema (**III**). **II** y **III** son mecanismos de compensación adaptativos. Sin embargo, tras procesos lesivos, se pueden desencadenar mecanismos disfuncionales (**IV**), donde se potencian o interconectan circuitos locales (célula marrón) dando lugar a un mal funcionamiento del sistema, produciendo diversos trastornos neurológicos. Las nuevas colaterales axonales se representan en color rojo. Las sinapsis potenciadas tras la lesión se representan en fucsia.

Así, por ejemplo, los accidentes cerebrovasculares desencadenan la generación de nuevas colaterales aferentes desde zonas homolaterales, adyacentes a la lesión (Carmichael y col., 2001; Li y col., 2015) o bien desde neuronas corticales del hemisferio no lesionado hasta regiones interconectadas, medulares (Bachmann y col., 2014; Lindau y col., 2014; Zhang y col., 2010) y/o troncoencefálicas (Bachmann y col., 2014; Seymour y col., 2005; Siegel y col., 2015) deaferentadas tras el daño, que llegan a formar nuevas conexiones (Carmichael y col., 2017; Murphy y Corbett, 2009).

Las lesiones de la médula espinal causan una disfunción motora inmediata debido a la separación de las vías de control superior de los circuitos espinales locales, y aunque la regeneración axonal tras un daño a nivel del SNC es limitada, la lesión parcial se acompaña con frecuencia de una recuperación funcional extensiva (Filli y Schwab, 2015), que sigue mecanismos de compensación funcional basados en la generación de nuevos terminales axonales (Collyer y col., 2014; Rosenzweig y col., 2010; Zhang y col., 2010; Zörner y col., 2014).

Sin embargo, en ocasiones, aunque se originen nuevas colaterales desde fibras no lesionadas, no se recupera la función perdida. En estos casos se produce un mecanismo de compensación por sinaptogénesis *de novo* debido a la generación de nuevas aferentes desde células que inicialmente no mantenían contacto sináptico con la neurona denervada, por lo que no se restaura el circuito original, aunque sigue siendo adecuado para la neurona reinervada (Figura 1B, III). Por ejemplo, la sección unilateral de aferentes hipocampales al núcleo septal produce una disminución en el número de sinapsis sobre las neuronas de dicho núcleo, que posteriormente se recuperan por la generación de colaterales emergentes desde las fibras hipocampales no lesionadas. Sin embargo, cuando la deaferentación es bilateral, los núcleos septales vuelven a recuperar el número de sinapsis previo a la lesión, indicando la formación de nuevas fibras desde otras zonas no interconectadas previamente, que no recuperan la funcionalidad pero que mantienen las propiedades de las neuronas postsinápticas (Field y col., 1980). Las aferencias son necesarias para el mantenimiento de la organización dendrítica, previniendo la retracción del árbol dendrítico postsináptico, así como la atrofia transneuronal que tiene lugar tras la deaferentación (Caceres y Steward, 1983; Nitsch y Frotscher, 1993). Además, las colaterales generadas pueden restablecer la pérdida del balance excitación-inhibición que puede tener lugar tras la deaferentación (Deller y Frotscher, 1997; Zhang y col., 2013), manteniendo estables y funcionales los circuitos sinápticos en que se integran (Dhar y col., 2016).

Ambos sistemas son mecanismos de compensación adaptativos, que tienen un papel fundamental en la reorganización y rehabilitación de las disfunciones sensoriales y motoras originadas tras lesiones en el SNC, y por tanto, tienden a aumentar la supervivencia de la neurona denervada. Los procesos de plasticidad sensorial cruzada son ejemplos de compensación funcional y sinaptogénesis *de novo*. La plasticidad sensorial cruzada es una reorganización adaptativa de neuronas que forman parte de uno o más sistemas sensoriales, que tiene lugar como consecuencia de la pérdida parcial o completa de aferencias periféricas (Merzenich y col., 1983; Newton y col., 2002; Nys y col., 2015; Zhang y col., 2013), proceso en el que se inervan otras áreas del cerebro previamente no interconectadas, o bien se potencian conexiones sinápticas ya existentes. Este fenómeno ocurre tanto en estadios tempranos del desarrollo como en adultos (Lazzouni y Lepore, 2014; Nys y col., 2015).

Sin embargo, a veces estos mecanismos plásticos no sólo no recuperan la función, sino que conducen a situaciones disfuncionales, no adaptativas (Mohan y Vanneste, 2017; Moxon y col., 2014). Así, se ha relacionado la generación de nuevas colaterales axonales durante procesos de reorganización sináptica con diferentes desórdenes neurológicos o motores, entre los que destacan los síndromes de percepción o dolor fantasma (Mohan y Vanneste, 2017; Møller, 2001, Figura 1B, IV). Por ejemplo, tras lesiones de la médula espinal, se puede producir la sensibilización central de las vías nociceptivas, desembocando en estados de dolor crónico neuropático (Baron, 2006; Gustin y col., 2010; Moxon y col., 2014; Woolf y Mannion, 1999) que se inician por deaferentación cortical somatosensorial, que induce una reorganización de los circuitos neuronales tras un daño a un nervio periférico, ya sea por un traumatismo menor o por situaciones más severas, como la amputación de una extremidad (Flor, 2002; Graziano y Jones, 2009). También se producen fenómenos de percepción fantasma por deaferentación sensorial auditiva, que consisten en la percepción de sonidos simples o complejos en ausencia de entrada auditiva externa, y que generalmente son conocidos como tinnitus o acúfenos (Møller, 2001). Se originan por cambios en la estructura de los circuitos neuronales del sistema auditivo, o bien por hiperactividad de ciertas neuronas que forman parte del mismo, tras la pérdida de aferentes sensoriales periféricos. Otros síndromes que se originan por las mismas causas son los síndromes vestibulares, que producen vértigo, mareo y náusea a quienes lo padecen. Además, la generación de nuevos terminales tras un daño nervioso se ha relacionado con algunos desórdenes neurológicos como la epilepsia (Buckmaster, 2014; Sloviter, 1994).

Los mecanismos de compensación mencionados no se producen de manera aislada; así, tras procesos lesivos a nivel del SNC, se desencadenan diferentes mecanismos plásticos compensatorios, adaptivos y no adaptativos, que se manifiestan y desarrollan en paralelo. Por

tanto, los procesos de generación de nuevas colaterales axonales señalan la importancia que tienen en el funcionamiento del sistema nervioso, independientemente de que sean beneficiosos o no.

1.2. Factores neurotróficos y plasticidad neuronal

Según la teoría trófica de las conexiones neuronales enunciada por Purves (1990), las neuronas dependen del soporte trófico dado por la diana para sobrevivir durante el desarrollo (Oppenheim, 1991; Purves, 1990). Sin embargo, hoy en día se acepta que el aporte trófico que reciben las células nerviosas no sólo sigue una vía retrógrada, sino también una vía anterógrada, a partir de sus neuronas aferentes. Además, existe un sustento trófico paracrino, endocrino y autocrino. El aporte trófico paracrino procede de células que se encuentran próximas a la diana, tales como células gliales, células de Schwann o células endoteliales capilares. El sustento trófico endocrino le llega de células distales, como las células ependimales, mediante la sangre o el líquido cefalorraquídeo. Por último, también pueden obtener factores tróficos de forma autocrina (Figura 2; Adaptado de Ekester, 2004).

Recientemente se ha demostrado que los factores tróficos no sólo tienen importancia durante el desarrollo, sino también durante la etapa adulta, cuando las neuronas siguen siendo trófico-dependientes, no ya para su supervivencia, sino para el mantenimiento de las propiedades intrínsecas propias del estado adulto (Lewin y Barde, 1996).

Como ya hemos visto anteriormente, la plasticidad sináptica dependiente de actividad abarca una amplia gama de modificaciones estructurales y funcionales que cubren escalas de tiempo que van desde milisegundos a meses (Citri y Malenka, 2008; Jamann y col., 2017). Numerosas y diversas señales moleculares están involucradas en los procesos de traducción de factores tróficos, desde cambios en los patrones de actividad a alteraciones en la conectividad y eficacia sináptica. Recientemente, se ha estudiado y demostrado el relevante papel de los factores neurotróficos como moléculas de señalización en fenómenos de plasticidad sináptica.

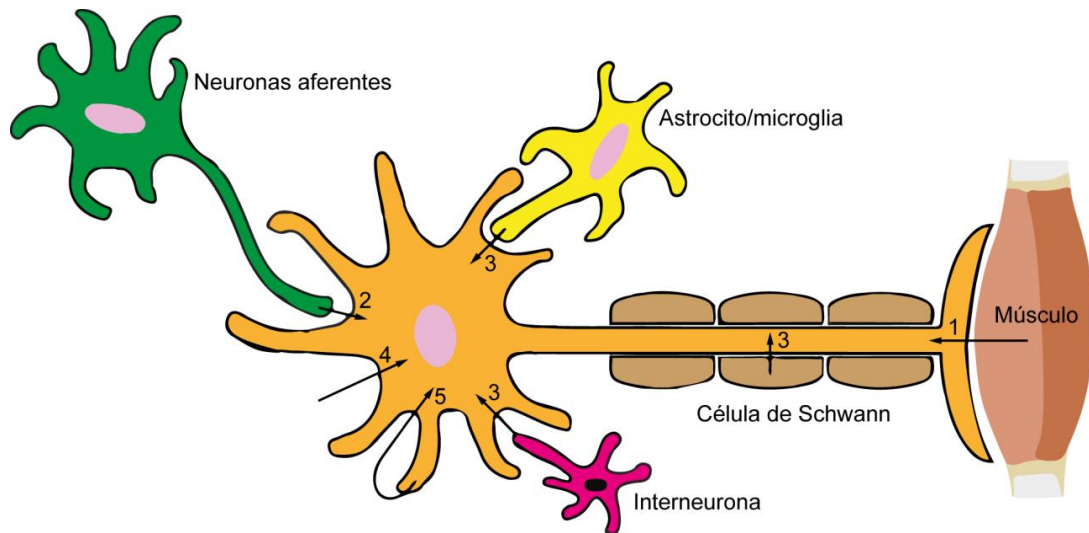


Figura 2. Esquema de los diferentes mecanismos de soporte neurotrófico en las células nerviosas: (1) transporte retrógrado desde la diana, (2) transporte anterógrado desde las aferencias, (3) soporte paracrino desde células cercanas como microglía, astrocitos, interneuronas o células de Schwann, (4) soporte endocrino desde células ependimales y (5) soporte autocrino. Adaptado de Ekester, 2004.

La lista de factores neurotróficos relacionados con mecanismos plásticos es muy extensa. Así, se ha estudiado la acción de factores neurotróficos pertenecientes a la familia de neurotrofinas (Bothwell, 2014; Gibon y Barker, 2017; McAllister y col., 1999), las neuroquinas (Gruol, 2015; Stowe y col., 2007; Tillo y col., 2012), la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (Böttner y col., 2013; Li y col., 2014; Toledo-Aral y col., 2003) o la superfamilia de los factores tróficos no neuronales (Dyer y col., 2016; Grosheva y col., 2016; Mysoet y col., 2015; Terauchi y col., 2010) durante procesos de plasticidad funcional y/o estructural a lo largo sistema nervioso, tanto en el desarrollo como en la etapa adulta. La diversidad de factores neurotróficos refleja el amplio espectro de posibles funciones biológicas en las que pueden participar.

El papel de las neurotrofinas en plasticidad durante el desarrollo, así como en procesos de memoria y aprendizaje o tras un daño nervioso en el adulto, ha sido ampliamente estudiado. Por ello, los siguientes apartados se centrarán en esta familia de factores tróficos y en su vinculación con cambios funcionales y estructurales de la conectividad sináptica.

1.2.1. Neurotrofinas

Las neurotrofinas conforman una de las familias de factores neurotróficos más estudiadas (Barde, 1990). Forman parte de ella el factor de crecimiento nervioso (NGF), que fue el primer factor neurotrófico descubierto (Levi-Montalcini, 1982; Levi-Montalcini y Cohen, 1960); el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; Barde y col., 1982; Leibrock y col., 1989), la neurotrofina 3 (NT-3; Honh y col., 1990; Jones y Reichardt, 1990) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5; Hallböök y col., 1991; Ip y col., 1992).

En mamíferos, todas las neurotrofinas, salvo NT-4/5, comparten características altamente conservadas en secuencia y estructura (Barde, 1994). Las neurotrofinas se sintetizan inicialmente como pre-pro-neurotrofinas en los ribosomas acoplados al retículo endoplásmico. Las formas precursoras se transfieren al aparato de Golgi, donde se degrada la región pre- y la proteína es plegada correctamente. Las pro-neurotrofinas siguen un proceso de proteólisis para dar lugar a la proteína madura de aproximadamente 13 kDa (Seidah y col., 1996). Desde este punto, las neurotrofinas son transportadas hasta vesículas, desde donde serán secretadas (Chao, 2003). Este hecho es interesante debido a que tanto las formas maduras como las inmaduras de las neurotrofinas tienen un efecto fisiológico a través de la unión a diferentes receptores (Chao, 2003; Lee y col., 2001). La vía de secreción principal de las neurotrofinas al espacio extracelular en neuronas difiere dependiendo del tipo de neurotrofina: NGF, NT-3 y NT4/5 siguen una vía de secreción constitutiva, mientras que la secreción del BDNF es regulada (Farhadi y col., 2000; Griesbeck y col., 1999; Hibbert y col., 2003; Mowla y col., 1999; Lu y col., 2005), aunque puede cambiar por diversos factores, tanto internos como externos (Lu y col., 2005).

1.2.2. Receptores de neurotrofinas

Las neurotrofinas ejercen su acción uniéndose a dos tipos distintos de receptores transmembrana (Figura 3). El primer tipo estaría constituido por una familia de receptores de alta afinidad llamada quinasa relacionada con la tropomiosina (*tropomyosin-receptor kinase*, Trk), con actividad tirosina quinasa. En mamíferos se han identificado tres genes de *trk* distintos, *trk a*, *trk b* y *trk c*, dando lugar a tres receptores Trk funcionalmente distintos, TrkA, TrkB y TrkC. Las neurotrofinas, en su forma madura, se unen específicamente a un receptor Trk en particular. Así, el NGF se une preferentemente a TrkA (Klein y col., 1991a), BDNF y NT4/5 a TrkB (Ip y col., 1992; Klein y col., 1991b), mientras que NT-3 se une preferentemente a TrkC (Lamballe y col., 1991), aunque también tiene capacidad de unirse con menor afinidad a TrkA y TrkB (Clary y Reichardt, 1994), provocando efectos diferentes cuando se une a estos receptores, que cuando se les unen sus neurotrofinas preferentes (Harrington y col., 2011; Reichardt, 2006). Los

receptores Trk están formados por tres regiones, una citosólica y otra extracelular, separadas por una región transmembrana. La región citosólica es un dominio con actividad tirosina quinasa. Por su parte, la región extracelular de los receptores Trk está constituida por 5 dominios diferentes: dos dominios cisteínas, entre los cuales se sitúa una repetición rica en leucina, seguidos de dos dominios de inmunoglobulina G (IgG) cercanos a la membrana (Chao, 2003), que es el lugar donde se unen las neurotrofinas y el que determina la especificidad de la unión (Lewin y Carter, 2014). La unión de homodímeros de neurotrofinas maduras a los receptores Trk produce la dimerización y fosforilación de los residuos de tirosina presentes en el dominio intracelular del receptor (Figura 3). Estos residuos constituyen los sitios de unión para las proteínas y enzimas intermediarias de la cascada de señalización que desencadenan. Se activan así una serie de rutas bioquímicas que culminan con la internalización del complejo receptor-neurotrofina, y su transporte hacia el soma neuronal, donde ejerce su acción sobre la síntesis de proteínas o ARN mensajero, aunque en ocasiones ejercen su acción directamente desde el terminal. Estas vías culminan con la regulación de la expresión de determinados genes, implicados en la diferenciación y supervivencia neuronal, o en la plasticidad sináptica, entre otros (Huang y Reichardt, 2003; Lu y col., 2005).

El segundo tipo de receptor al que se unen las neurotrofinas es un receptor de baja afinidad llamado p75, miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (Chao y Hempstead, 1995). A este receptor se pueden unir tanto las formas pro-neurotrofinas como las formas maduras de las cuatro neurotrofinas, aunque estas últimas con menor afinidad (Figura 3), también como homodímeros. Esta unión produce la activación de vías de señalización diferentes a las que se activan con Trk y que desencadenan efectos diversos y a veces opuestos, como la supervivencia frente a la apoptosis, y el crecimiento frente al colapso axonal y la detención del ciclo celular, dependiendo de que se una la neurotrofina madura o inmadura, respectivamente (Arévalo y Wu, 2006; Lu y col., 2005). Además se sabe que las pro-neurotrofinas se unen al receptor p75 en forma de complejo con otras proteínas como la sortilina o SorCS2, dos miembros de la familia VPS10 (Bradshaw y col., 2015; Gibon y Barker, 2017). El receptor p75 posee cuatro repeticiones ricas en cisteína y un dominio intracelular que carece de actividad tirosina quinasa. Las neuronas expresan en sus membranas ambos tipos de receptores, lo que permite la transducción de señales muy diferentes. Además, entre las vías de señalización que generan ambos receptores existe cierta comunicación a través de proteínas que actúan como segundos mensajeros en una de las rutas y que activan o inhiben a enzimas de la otra, interactuando física y funcionalmente entre ellas, provocando efectos sinérgicos, que

conducen a incrementos en la efectividad de su acción, lo que permite un ajuste fino de su respuesta (Yoon y col., 1998).

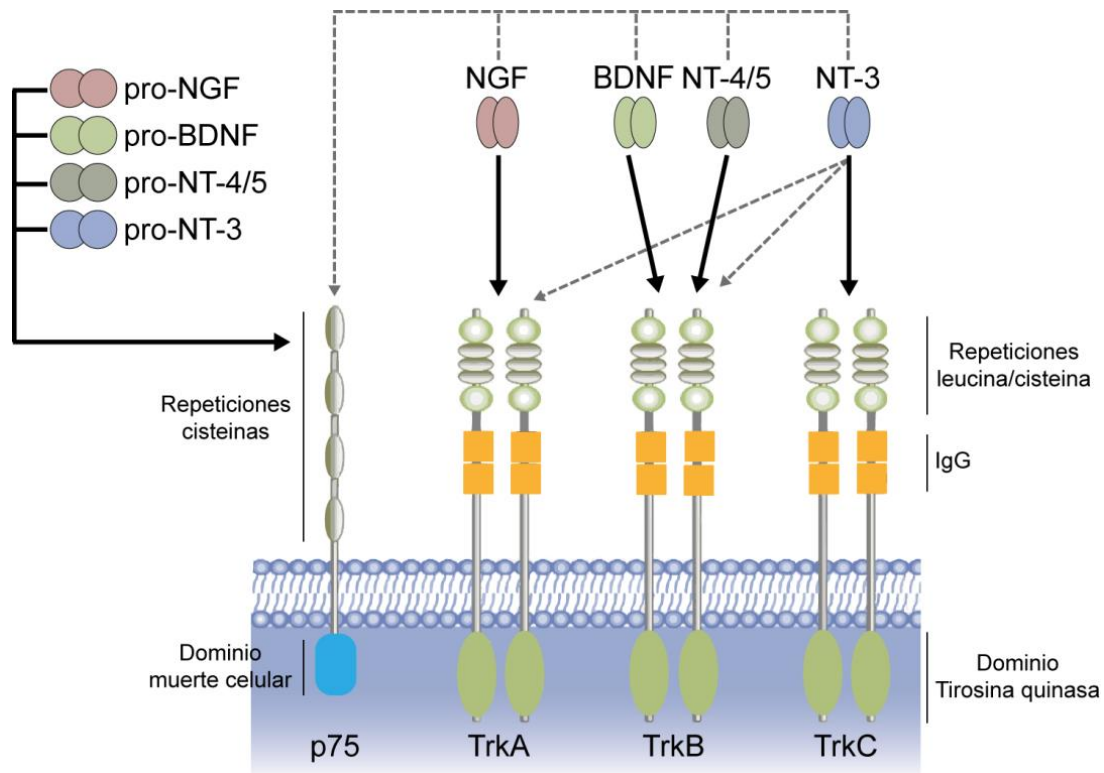


Figura 3. Modelos de activación de los receptores tirosina quinasa (Trk) y p75. Representación de las interacciones entre las neurotrofinas y sus receptores. La unión de una neurotrofina resulta en la dimerización de su receptor. Las neurotrofinas se unen selectivamente a los receptores Trk, o de forma inespecífica al receptor p75, al cual se unen también las formas pro- o inmaduras. Nótese la capacidad del factor neurotrófico NT-3 de unirse con baja afinidad a los receptores Trk específicos para otras neurotrofinas. Adaptado de Bradshaw y col., 2014; Skaper, 2012.

1.2.3. Efectos biológicos de las neurotrofinas: papel en procesos de plasticidad sináptica

Las neurotrofinas tienen un extraordinario rango de funciones biológicas, que dependen del receptor al que se unan y si lo hacen como pro-neurotrofinas o como formas maduras (Bothwell, 2014; Lee y col., 2001).

Las neurotrofinas son péptidos que actúan como factores de crecimiento durante el desarrollo, contribuyendo al mantenimiento de poblaciones neuronales en el sistema nervioso. Estas proteínas regulan muchas funciones de neuronas, incluyendo la supervivencia (Oppenheim

y col., 1992), diferenciación y migración de las células nerviosas (Lindholm y col., 1997; Tanaka y col., 2000), así como el crecimiento axonal o dendrítico (McAllister, 2001; McAllister y col., 1996), y la formación y funcionamiento de las sinapsis (Causing y col., 1997; Han y col., 2016).

Pero no sólo son importantes en el sistema nervioso inmaduro, sino también durante la edad adulta, cuando intervienen activamente en procesos de plasticidad neuronal (Bothwell, 2014; Lewin y Barde, 1996; McAllister y col., 1999; Skaper, 2012), como cambios en la función sináptica y en la excitabilidad de la membrana, así como modificaciones morfológicas y de conectividad. Así, se han implicado en la regulación y mantenimiento de múltiples propiedades funcionales de adultos en condiciones control. Las neurotrofinas participan en procesos de plasticidad sináptica (McAllister y col., 1999; Gibon y Barker, 2017; Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2013), modificando la efectividad sináptica de las conexiones neuronales en experimentos *in vitro* (Han y col., 2016; Kang y Schuman, 1995) e *in vivo* (Ramos-Languren y Escobar, 2013) a lo largo del sistema nervioso. Se ha demostrado que las neurotrofinas pueden modificar la liberación de neurotransmisores desde los terminales presinápticos a nivel del SNC (Lemtiri-Chlieh y Levine, 2010; Sala y col., 1998; Tyler y col., 2002) y producir cambios en la densidad de receptores en las membranas postsinápticas (Riffault y col., 2014; Sharma y col., 1993).

En efecto, los factores neurotróficos pueden funcionar como neuromoduladores, alterando rápidamente las propiedades electrofisiológicas de las neuronas, que modifican la excitabilidad de la membrana (Holm y col., 2009; Nieto-González y Jensen, 2013; Yamuy y col., 2000; Zhang y col., 2012). Destaca el papel del BDNF sobre las propiedades eléctricas intrínsecas de neuronas, disminuyendo la excitabilidad de membrana, y sobre la composición sináptica, donde ejerce su acción sinaptotrófica fundamentalmente sobre las entradas inhibitorias (Holm y col., 2009; Huang y col., 1999; Nieto-Gonzalez y Jensen, 2013; Rutherford y col., 1997). Además, las neurotrofinas intervienen en el mantenimiento y modulación de las aferencias sinápticas (Causing y col., 1997; Roosen y col., 2001) en el adulto.

También, las neurotrofinas pueden mediar cambios en la arborización axonal y dendrítica, que puede conducir a modificaciones en el número y localización de sinapsis funcionales (Gómez-Palacio-Schjetnan y Escobar, 2013; Han y col., 2016; Li y col., 2012; McAllister y col., 1999; Ramos-Languren y Escobar, 2013).

Por otro lado, estos factores tróficos intervienen en diferentes procesos desencadenados en respuesta a la lesión. Se ha observado que la administración exógena de neurotrofinas tras lesiones a nivel del SNC favorece el mantenimiento de las propiedades

funcionales y morfológicas de las neuronas, o bien produce la recuperación de algunas de las funciones perdidas tras el trauma (Caleo y col., 2003; Davis-López de Carrizosa y col., 2009, 2010; Grill y col., 1997; Novikov y col., 2000); incluso puede favorecer la regeneración axonal en neuronas espinales, motoras o sensitivas, axotomizadas (Johnson y col., 2000; Kobayashi y col., 1997; Ye y Houle, 1997).

Finalmente, se ha demostrado que tras lesiones del SNC se producen cambios en la expresión de neurotrofinas o de sus receptores (Bucklan y Cunningham, 1999; Gomez-Pinilla y col., 2004; Grosheva y col., 2016; Johnson y col., 2000; Kobayashi y col., 1997; Li y col., 2007; Morcuende y col., 2011; Tonra y col., 1998; Widenfalk y col., 2001). Además, numerosos estudios han puesto de manifiesto que estos factores tróficos favorecen la generación de colaterales axonales regenerativos tras procesos lesivos en el SNC (DeCouto y col., 2003; Schnell y col., 1994; Scott y col., 2005; Tropea y col., 2003; Ye y Houle, 1997). Así, la administración exógena de NGF favorece el brote nuevos terminales desde fibras colinérgicas y sensitivas a lo largo del SNC (Oudega y Hagg, 1996; Varon y col., 1995) y que la administración de anticuerpos frente a esta neurotrofina bloquea la generación de las fibras axonales emergentes (van der Zee y col., 1992; Holtzman y Lowenstein, 1995).

Por todo ello, las neurotrofinas son mediadores clave en los procesos de plasticidad que tienen lugar en el SNC, fundamentales para el desarrollo de los mecanismos de compensación funcionales y/o estructurales tras procesos lesivos. Así, en el presente trabajo se estudiará el patrón neurotrófico de las neuronas centrales deaferentadas.

1.3. Sistema oculomotor

1.3.1. Organización anatómica del sistema oculomotor

1.3.1.1. Musculatura extraocular

Las rotaciones del ojo se llevan a cabo por la contracción de 6 músculos extraoculares: recto medial o interno, recto lateral o externo, recto superior, recto inferior, oblicuo superior y oblicuo inferior (Figura 4A). Todos, con la excepción del oblicuo inferior, se originan en un anillo tendinoso en el vértice de la órbita, llamado anillo de Zinn. El músculo oblicuo inferior parte de la zona nasal e inferior de la órbita (Sharpe y Wong, 2005).

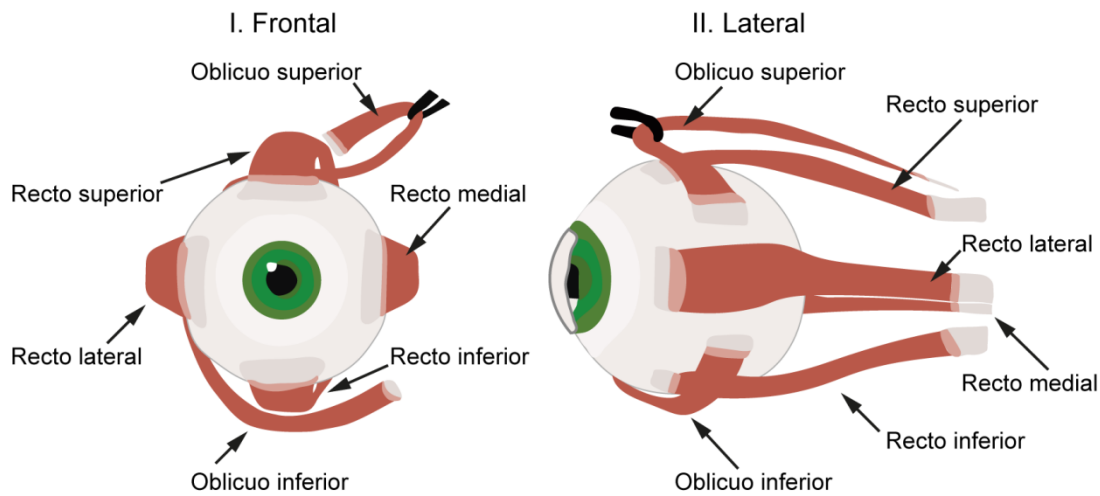
El ojo, desde el punto de vista mecánico, es una esfera que puede realizar movimientos de gran rapidez y precisión en torno a tres ejes imaginarios y ortogonales, que intersectan en el

centro de la órbita: eje vertical, eje horizontal y eje antero-posterior. Así, el ojo puede realizar movimientos en torno al eje vertical, que corresponden a movimientos en el plano horizontal; movimientos en torno al eje horizontal, que corresponden a movimientos en el plano vertical; o bien movimientos giratorios alrededor del eje antero-posterior, que se denominan movimientos torsionales. Los movimientos horizontales pueden ser en dirección nasal o medial (aducción) o bien en dirección temporal o lateral (abducción). Por su parte, los movimientos verticales conllevan movimientos del ojo de elevación o bien depresión. Finalmente, existen movimientos giratorios en el eje antero-posterior: si el ojo se desplaza en dirección nasal se denomina intorsión, si lo hace en dirección temporal, extorsión (Porter y col., 1995; Sharpe y Wong, 2005)

Los músculos extraoculares funcionan como tres pares de músculos antagónicos entre sí. El primer par lo conforman el recto medial y el recto lateral, que se insertan en el globo ocular en posición nasal y temporal respectivamente, y que producen los movimientos en el plano horizontal. El segundo par está formado por el recto superior y el recto inferior, que intervienen en los movimientos del ojo en el plano vertical, y se insertan en la parte superior e inferior de la órbita, respectivamente. Por último, el oblicuo superior y el oblicuo inferior, insertados 45 grados por encima y por debajo del recto medial, respectivamente, son los músculos que participan en las rotaciones del ojo en el eje antero-posterior (Figura 4A, Spencer y Porter, 2006).

Los músculos extraoculares están compuestos por un número variable de fibras, siendo el recto medial el de mayor masa muscular y el oblicuo inferior el de menor (Spencer y Porter, 2006). Aunque poseen características variables, como longitud, masa o tamaño del tendón, otras propiedades son comunes a todos los músculos extraoculares. Así, están constituidos por paquetes de fibras musculares cuyo diámetro es variable, aunque de menor calibre que el de otros músculos esqueléticos. En la musculatura extraocular podemos distinguir dos capas: una primera capa externa llamada capa orbital, adyacente a los huesos de la órbita, y una segunda capa, más interna, llamada capa global, adyacente al ojo y al nervio óptico (Porter y col., 1995). Otra característica única de los músculos extraoculares es la rica inervación que reciben de las neuronas motoras. Cada motoneurona oculomotora inerva muy pocas fibras musculares si se compara con otros músculos estriados. Así, poseen unidades motoras muy pequeñas, dando lugar a fibras musculares inervadas por una sola neurona motora en la capa global y de 2 a 5 en la capa orbital, lo que ofrece un amplio rango dinámico y un control muscular fino y preciso de los movimientos del ojo (Porter y col., 1995; Spencer y Porter, 2006).

A. Musculatura extraocular



B. Núcleos oculomotores

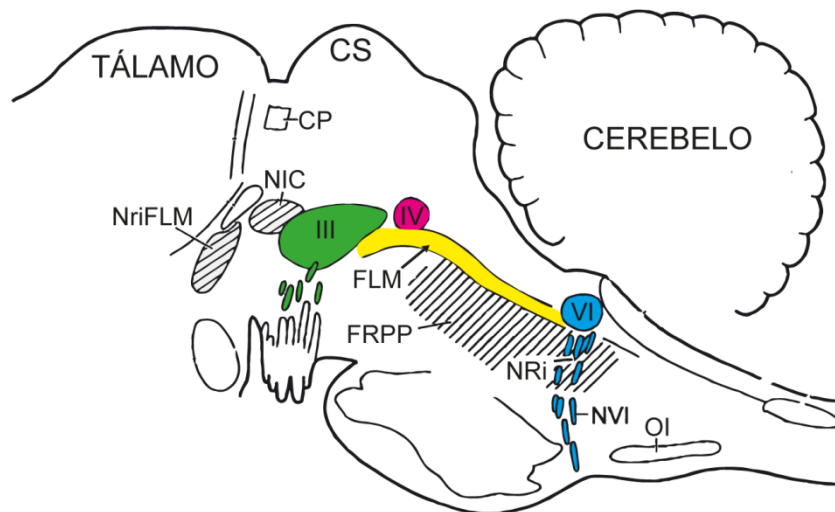


Figura 4. Organización del sistema oculomotor. A: Dibujo que muestra un ojo desde una perspectiva frontal y lateral junto con la musculatura extraocular que interviene durante los movimientos oculares. Los músculos extraoculares se organizan en tres pares antagónicos: los músculos recto lateral y recto medial, los músculos recto inferior y recto superior, y los músculos oblicuo superior y oblicuo inferior. La contracción y relajación coordinada de los mismos permite la realización de los diferentes movimientos oculares. B: Esquema sagital del tronco del encéfalo representando la posición anatómica de los núcleos del sistema oculomotor: núcleo motor ocular común (III, verde), núcleo motor ocular troclear (IV, rosa) y núcleo motor ocular externo (VI, azul). FLM: fascículo longitudinal medial (amarillo). CS: colículo superior. CP: comisura posterior. NIC: núcleo intersticial de Cajal. NriFLM: núcleo rostral del FLM. FRPP: formación reticular pontina paramediana. NRi: núcleo del rafe interpositus. NVI: nervio del VI par. OI: oliva inferior. Adaptado de Büttner-Ennever, 2008.

En la musculatura extraocular se han identificado hasta seis tipos de fibras musculares diferentes, las cuales pueden dividirse en dos categorías (Büttner-Ennever, 2006; Büttner-Ennever y col., 2001): fibras de innervación única, conocidas como SIF (del inglés *singly innervated fiber*) y fibras de innervación múltiple, llamadas MIF (del inglés *multiply innervated fiber*). En la capa orbital, alrededor del 80% de las fibras son innervadas individualmente. Estas fibras tienen un contenido alto de mitocondrias y enzimas oxidativas, lo que da a lugar a contracciones más rápidas a la vez que muestran más resistencia a la fatiga. El 20% restante de las fibras orbitales son fibras de innervación múltiple, con menor contenido en mitocondrias y enzimas oxidativas, por lo tanto de contracción más lenta y menor resistencia a la fatiga. En la capa global se distinguen cuatro tipos diferentes de fibras, tres de ellas son fibras de tipo SIF, diferenciándose entre ellas por la capacidad de contracción y la resistencia a la fatiga. El cuarto tipo son fibras tipo MIF, las menos abundantes, de contracción lenta y baja resistencia a la fatiga (Büttner-Ennever, 2006; Porter y col., 1995; Zimmermann y col., 2013). Así, la mayoría de las fibras musculares son fibras de contracción rápida, lo que explica la alta velocidad a la que pueden realizar algunos tipos de movimientos (Shall y Goldberg, 1992).

1.3.1.2. Núcleos oculomotores

Las motoneuronas oculomotoras se distribuyen en tres núcleos, cuya organización está altamente conservada a través de la evolución filogenética de los vertebrados (Figura 4B).

Núcleo motor ocular común (NMOC): también llamado complejo oculomotor, consiste en una masa alargada de células, ventrolaterales al fascículo longitudinal medial (FLM), situadas en posición ventral a la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo, a nivel del tubérculo cuadrigémino superior (Figura 4B, III). Se extiende rostralmente hasta la comisura posterior y caudalmente hasta la unión ponto-mesencefálica. El complejo oculomotor se divide en dos regiones, rostral y caudal, ocupando cada una de ellas aproximadamente la mitad del núcleo. En la división rostral la columna de células está ampliamente separada de la línea media por el núcleo Edinger-Westphal. Experimentos previos en mono (Büttner-Ennever y col., 2001), en gato (Akagi, 1978; Gacek, 1974; Miyazaki, 1985; Naito y col., 1974), conejo (Akagi, 1978; Murphy y col., 1986) o rata (Glicksman, 1980; Labandeira-García y col., 1983) han demostrado que las motoneuronas del NMOC se organizan topográficamente, distinguiéndose diferentes poblaciones neuronales desde la región rostral a la caudal, aunque con cierto grado de solapamiento. Además, se ha comprobado que la organización interna básica del NMOC está bastante conservada en todos los órdenes de vertebrados (Büttner-Ennever, 2006). Este núcleo contiene las motoneuronas que inervan a los músculos recto inferior, recto medial y oblicuo

inferior homolaterales, así como al músculo recto superior contralateral. En la subdivisión rostral y en posición dorsal aparecen las motoneuronas que inervan al recto medial. También en la región rostral pero en disposición ventral, aparecen las motoneuronas del recto inferior. Las motoneuronas que inervan al recto superior se sitúan en la región caudal en posiciones mediales. Finalmente, las neuronas motoras del oblicuo inferior aparecen en la subdivisión caudal, en posiciones laterales (Evinger, 1988; Gacek, 1974). En el NMOC también se incluyen las motoneuronas que inervan el músculo elevador del párpado, cuya posición es variable entre los diferentes grupos de vertebrados (Büttner-Ennever, 2006). Las motoneuronas del NMOC proyectan a través del III par craneal, el más grande y complejo de los tres nervios oculomotores. Además, contiene fibras motoras viscerales que inervan al esfínter de la pupila y al músculo ciliar.

Por otra parte, se han descrito diversas poblaciones de interneuronas en el NMOC (Chung y col., 1987; Clendaniel y Mays, 1994; Maciewicz y col., 1975). Estas células aparecen distribuidas entremezcladas con las motoneuronas oculomotoras, tanto dentro del núcleo como en la periferia del mismo, e incluso algunas de ellas aparecen dispersas dorsales al NMOC, en la región supraoculomotora (de la Cruz y col., 1998), proyectando a diferentes zonas como la médula espinal, el cerebelo o el NMOE, así como intranuclearmente. De todas ellas, la vía más estudiada y conocida es la proyección bilateral hacia el NMOE, la cual inerva monosinápticamente a las motoneuronas abductoras (Büttner-Ennever y col., 2003; de la Cruz y col., 1992). Estas células poseen un disparo similar a las motoneuronas del recto medial del NMOC homolateral, participando en la coordinación de los músculos agonistas recto medial y recto lateral durante los movimientos conjugados de los ojos en el plano horizontal (Clendaniel y Mays, 1994; Ugolini y col., 2006).

Núcleo motor ocular troclear (NMOT): localizado en la sustancia gris del mesencéfalo, a nivel del tubérculo cuadrigémino inferior e inmediatamente caudal al NMOC pero algo más lateral (Figura 4B, IV). Este núcleo contiene las motoneuronas que inervan mayoritariamente al músculo oblicuo superior contralateral (95% del total), y en menor medida al homolateral (5% del total; Miyazaki, 1985). Las motoneuronas del NMOT proyectan sus axones por el IV par craneal, el más pequeño de los tres pares craneales oculomotores (Sharpe y Wong, 2005).

Núcleo motor ocular externo (NMOE): se encuentra dorsal en el puente, bajo la rodilla del nervio facial (Figura 4B, VI). El NMOE contiene dos poblaciones de neuronas bien definidas: por un lado las motoneuronas que inervan al recto lateral homolateral y cuyos axones discurren por el VI par craneal, y por otro las neuronas internucleares cuyos axones ascienden a través del

FLM contralateral hacia el NMOC, donde establecen contacto sináptico excitador con las motoneuronas del recto medial (Delgado-García y col., 1986b; Highstein y Baker, 1978). En gatos y ratas, las neuronas internucleares aparecen entremezcladas por todo el núcleo, aunque parecen ser más abundantes en la porción rostral. Además, la proporción de motoneuronas y neuronas internucleares en el NMOE es de 2/3:1/3 respectivamente (Cabrera y col., 1988; Steiger y Büttner-Ennever, 1978). Sin embargo, en primates, las neuronas internucleares se sitúan laterales a las raíces del VI par craneal (Büttner-Ennever, 2006). El tamaño de estas neuronas internucleares es ligeramente menor que el de las motoneuronas abductoras, tanto en gato (Spencer y Sterling, 1977) como en conejo (Labandeira-Garcia y col., 1989). Ambos tipos celulares presentan un disparo tónico-fásico, controlando cada población la actividad de músculos antagonistas para la realización de los movimientos horizontales conjugados (Delgado-García y col., 1986b; Fuchs y col., 1988).

1.4. Modelo experimental

En el presente trabajo hemos tomado como modelo experimental el sistema oculomotor, y en particular las motoneuronas que inervan al músculo recto medial y sus aferencias.

1.4.1. Motoneuronas del recto medial del NMOC

1.4.1.1. Localización de las motoneuronas del recto medial

La subdivisión del recto medial del NMOC está constituida por la población de motoneuronas que inervan al músculo recto medial homolateral, y que junto con las motoneuronas del NMOE homolateral controlan los movimientos oculares del ojo en el plano horizontal. En el gato, las motoneuronas que controlan al recto medial están localizadas principalmente en la subdivisión rostral del NMOC (Figura 5), la cual posee una forma redondeada en su porción más rostral, y se va alargando y estrechando caudalmente, hasta la mitad del núcleo. En la población de motoneuronas del recto medial se distinguen dos subgrupos; un subgrupo dorsolateral que comienza en la región más rostral y que se extiende sobre las 3/4 partes del núcleo; y un subgrupo ventrolateral al FLM, más caudal, que incluye algunas motoneuronas dispersas en este fascículo (Akagi, 1978; Gacek, 1974; Miyazaki, 1985; Naito y col., 1974). Esta misma organización se ha observado tras experimentos morfológicos con trazadores neuronales en la rata (Glicksman y col., 1980; Labandeira-García y col., 1983). Sin embargo, en el mono la subdivisión recto medial se divide en tres subgrupos claramente

distinguibles (Büttner-Ennever, 2006; Büttner-Ennever y Akert, 1981); el grupo A, en posición ventral, que se extiende hasta el FLM; el grupo B, dorsolateral, que posee las motoneuronas de mayor tamaño; y el grupo C, que contiene a las motoneuronas de menor tamaño y que se extiende dorsomedialmente en la periferia del NMOC, en la zona supraoculomotora (Büttner-Ennever y Akert, 1981; Büttner-Ennever y col., 2001).

1.4.1.2. Fisiología de las motoneuronas del recto medial

Características morfológicas e histoquímicas: Las motoneuronas del sistema oculomotor poseen en general una forma poligonal y multipolar. El patrón de ramificación dendrítica de estas células presenta diferencias morfológicas y de tamaño con respecto a otras motoneuronas craneales y espinales (Carrascal y col., 2005, 2006; Grantyn y col., 1977; Grantyn y Grantyn, 1978). Específicamente, las motoneuronas que inervan el músculo recto medial presentan un tamaño de 20-60 μm (Markham y col., 1986). Las motoneuronas del recto medial de mayor tamaño poseen formas multipolares con varias dendritas principales que surgen desde el soma; sin embargo, las motoneuronas de menor tamaño son bipolares y fusiformes (Markham y col., 1986). Además, se ha demostrado que las motoneuronas del recto medial emiten colaterales axonales dentro del propio núcleo, hasta la zona supraoculomotora e incluso hacia la parte ventral y lateral del FLM, sin tener efecto sináptico recurrente sobre sí mismas u otras motoneuronas oculomotoras (Evinger y col., 1979; Spencer y col., 1982).

Las motoneuronas del recto medial son colinérgicas (Kus y col., 2003). Estas células se caracterizan por expresar diferentes proteínas tamponadoras de calcio y receptores de moléculas tróficas en sus membranas. Así, se ha comprobado que las motoneuronas oculomotoras, incluyendo la subdivisión del recto medial, expresan los receptores TrkA, TrkB y TrkC para neurotrofinas en gato (Benítez-Temiño y col., 2004) y rata (Morcuende y col., 2011) adultos. Además, en rata también se ha comprobado que las motoneuronas oculomotoras presentan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en mayor proporción que otros núcleos troncoencefálicos no oculomotores (Silva-Hucha y col., 2017). Por otro lado, las neuronas motoras del recto medial son inmunopositivas para parvalbúmina, y presentan terminales aferentes positivos para parvalbúmina y calretinina, y en menor medida calbindina (de la Cruz y col., 1998). Además, estas neuronas presentan terminales inmunopositivos para GABA y glicina rodeando al soma y dendritas proximales (de la Cruz y col., 1992; Spencer y col., 1989; Wentzel y col., 1996, 1993), siendo ambos neurotransmisores inhibitorios. Sin embargo, y como veremos a continuación, las dos entradas principales a las motoneuronas del recto medial son de carácter excitador (Baker y Highstein, 1978).

Patrón de disparo: Las motoneuronas extraoculares muestran un patrón de disparo tónico-fásico, que se correlaciona durante la vigilia con la posición y la velocidad ocular (de la Cruz y col., 1989; Delgado-García y col., 1986a; Fuchs y col., 1988). Así, las motoneuronas del recto medial emiten brotes de potenciales de acción que preceden a los movimientos sacádicos de aducción, realizados en dirección nasal (*on*), cuya amplitud es directamente proporcional a la velocidad del ojo, mientras que su frecuencia de disparo disminuye o cesa durante los sacádicos en dirección temporal o de abducción (*off*). Además, durante las fijaciones oculares, una vez alcanzado el umbral de reclutamiento, muestran una tasa de disparo tónica directamente proporcional a la posición ocular, que se incrementa progresivamente para fijaciones cada vez más nasales (de la Cruz y col., 1989). Las motoneuronas del recto medial de un ojo actúan sinérgicamente con las motoneuronas del recto lateral del otro ojo durante los movimientos horizontales conjugados (Delgado-García y col., 1986a; Fuchs y col., 1988; González-Forero y col., 2003).

1.4.2. Aferencias a las motoneuronas del recto medial

Las motoneuronas del recto medial poseen dos entradas principales de origen pontino que serán objeto de estudio en la presente tesis. En primer lugar reciben aferencias cruzadas desde las neuronas internucleares del NMOE contralateral, cuyos axones cursan por el FLM, y por otro lado, son inervadas por neuronas del núcleo vestibular lateral (NVL), cuyos axones forman el tracto ascendente de Deiters (TAD; Figura 5).

1.4.2.1. Neuronas internucleares del NMOE

Las neuronas internucleares del NMOE proyectan a través del FLM contralateral para contactar monosinápticamente con las motoneuronas del recto medial (Figura 5; Highstein y Baker, 1978; Highstein y col., 1982). Esta proyección representa la principal entrada pontina a la subdivisión del recto medial. Es una entrada excitadora (Highstein y Baker, 1978; Nakao y Sasaki, 1980), que lleva información relativa a la posición y a la velocidad ocular durante todos los tipos de movimientos oculares (Büttner-Ennever y Akert, 1981; Delgado-García y col., 1986b; Fuchs y col., 1988), salvo para los de vergencia (Mays y Porter, 1984).

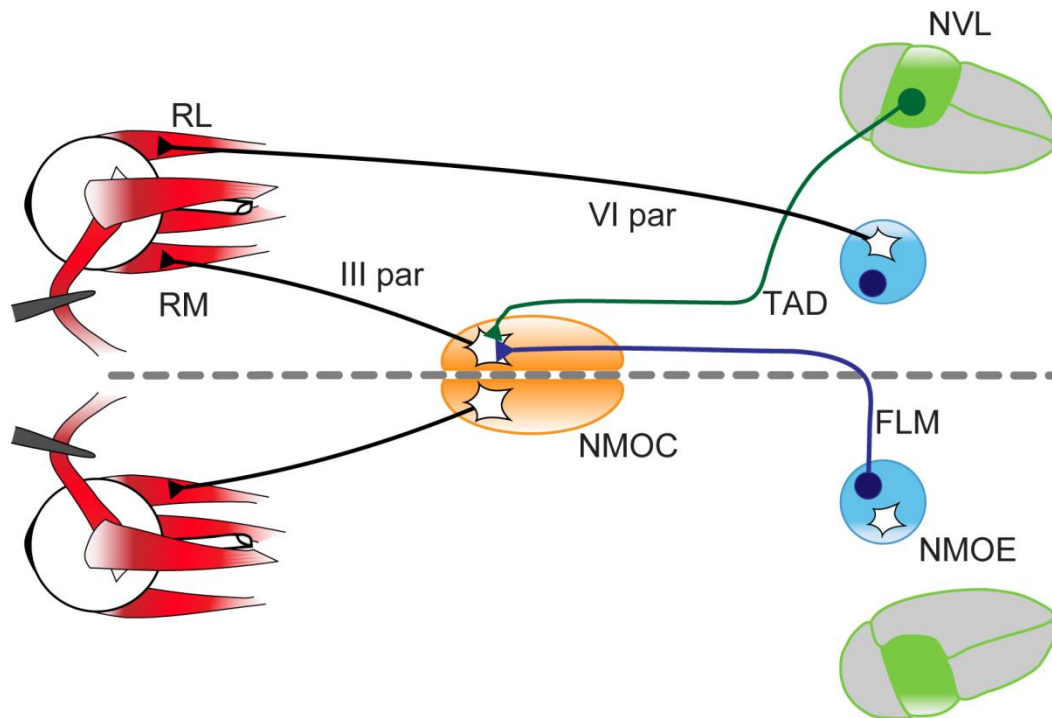


Figura 5. Esquema de las motoneuronas del recto medial del núcleo motor ocular común (NMOC) y sus principales aferencias pontinas. Se representan los músculos que producen los movimientos oculares en el plano horizontal, el recto medial (RM) y el recto lateral (RL), junto con las motoneuronas (células estrelladas) que controlan su actividad, presentes en el NMOC (naranja) y el núcleo motor ocular externo (NMOE, azul), y cuyos axones cursan por el III y VI par craneal, respectivamente. Las motoneuronas que controlan la actividad del RM reciben entradas sinápticas de las neuronas internucleares del NMOE a través del fascículo longitudinal medial (FLM), y de neuronas vestibulares del núcleo vestibular lateral (NVL, verde) que forman el tracto ascendente de Deiters (TAD).

Las neuronas internucleares comparten aferencias con las motoneuronas del NMOE, presentando ambos tipos celulares un patrón de descarga tónico-fásico similar al descrito para las motoneuronas del recto medial (Delgado-García y col., 1986b; Fuchs y col., 1988). Reciben aferencias directas de un sistema triple de proyecciones excitadoras e inhibitorias, que proceden fundamentalmente de los núcleos vestibulares, de la formación reticular pontobulbar y del núcleo *prepositus hypoglossi*, que están implicadas en la generación de los movimientos oculares compensatorios lentos durante el reflejo vestibulo-ocular, de los movimientos sacádicos y de las fijaciones oculares, respectivamente (Delgado-García y col., 1989; Escudero y Delgado-García, 1988, Escudero y col., 1992). Por otro lado, ultraestructuralmente las neuronas internucleares del NMOE contactan principalmente sobre dendritas distales de las motoneuronas del recto medial (Nguyen y col., 1999a), utilizando tanto glutamato como aspartato como neurotransmisor excitador (Nguyen y col., 1999b).

La lesión del FLM origina que los movimientos oculares se vuelvan descoordinados (de la Cruz y col., 2000), produciendo el síndrome de oftalmoplejia internuclear (Delgado-García y col., 1986b; Highstein, 1977; Highstein y Baker, 1978), debido a la interrupción de la actividad fisiológica desde las neuronas internucleares del NMOE al músculo recto medial contralateral. Este síndrome se caracteriza por la imposibilidad de realizar movimientos de aducción del ojo homolateral a la lesión más allá de la línea media del campo visual (de la Cruz y col., 2000), salvo para movimientos de vergencia.

1.4.2.2. Núcleo vestibular lateral

El complejo vestibular se localiza en la protuberancia del trono del encéfalo, lateral al NMOE, y en él se distinguen anatómicamente y funcionalmente cuatro núcleos: el núcleo vestibular superior o de Bechterew (NVS), el NVL o de Deiters, el núcleo vestibular medial o triangular (NVM), núcleo vestibular inferior o descendente (NVD), además de una serie de grupos o subnúcleos, entre los que destaca el grupo Y (Highstein y Holstein, 2006). Estos núcleos vestibulares reciben una proyección disináptica procedente del laberinto vestibular, a través de neuronas localizadas en el ganglio de Scarpa (Goldberg y Fernández, 1975). Además, se ha comprobado que existe una proyección monosináptica entre el canal semicircular horizontal y neuronas del NVM y del NVL en monos (McCrea y col., 1987), gatos (Baker y Highstein, 1978; Highstein y Reisine, 1981; Reisine y Highstein, 1979; Reisine y col., 1981) y conejos (Highstein, 1973). Estas aferencias presentan una tasa de potenciales de acción proporcional a la velocidad de rotación de la cabeza en el plano horizontal, aumentando si el giro es en dirección homolateral y disminuyendo si es en dirección contralateral.

A su vez, el NVL se divide en dos regiones, la región dorsal o de Deiters y la región ventral. La región ventral recibe aferencias monosinápticas excitadoras desde los canales semicirculares horizontales. El NVL ventral se distribuye como un grupo de células en posición ventral al NVS que se caracteriza por presentar neuronas multipolares con somas elipsoidales de pequeño y mediano tamaño (Highstein y Holstein, 2006; Reisine y col., 1981). El NVL recibe aferencias cerebelosas, principalmente entradas homolaterales desde la región anterior de la vermis y bilaterales desde la parte más rostral del núcleo fastigial (Carleton y Carpenter, 1983; Langer y col., 1985). Destaca la ausencia de fibras comisurales conectando con el complejo vestibular contralateral (Carleton y Carpenter, 1983).

En gatos y monos, se ha descrito que la región ventral del NVL junto con algunas células de la región rostral del NVM proyectan hasta las motoneuronas del recto medial homolateral formando el TAD (Figura 5, Carpenter y Carleton, 1983; Furuya y Markham, 1981; Highstein y

Holstein, 2006; Baker y Highstein, 1978; Highstein y Reisine, 1981; McCrea y col., 1987; Reisine y col., 1981). Se trata de una proyección excitadora, que discurre por el tegmento pontino lateral, entre el brachium conjuntivo y el FLM (Baker y Highstein, 1978; Highstein y Reisine, 1981; Reisine y Highstein, 1979; Reisine y col., 1981). Las neuronas vestibulares cuyos axones discurren por el TAD modulan principalmente durante movimientos rotatorios de la cabeza en el plano horizontal, y en menor medida para la posición ocular y mínimamente para la velocidad ocular durante movimientos oculares espontáneos (Reisine y Highstein, 1979; Reisine y col., 1981). Por tanto, esta vía lleva a las motoneuronas del músculo recto medial principalmente información de velocidad de la cabeza (Baker y Highstein, 1978; Highstein y Reisine, 1981; Ryu y McCabe, 1971).

Por otro lado, las neuronas vestibulares del TAD hacen contacto sináptico principalmente sobre el soma y dendritas proximales de las motoneuronas del recto medial (Furuya y Markham, 1981; Markham y col., 1986; Nguyen y col., 1999a), usando glutamato como neurotransmisor (Nguyen y col., 1999b).

La excitación sobre las motoneuronas del recto medial, desde las neuronas del TAD así como desde las neuronas internucleares del NMOE, es única, ya que por un lado, no responden al modelo del arco trineuronal que sigue la innervación vestibular a las motoneuronas del NMOE; y por otro, la inhibición disináptica presente en las neuronas del NMOE está ausente en las motoneuronas del recto medial (Baker y Highstein, 1978; Highstein y Reisine, 1981). Sin embargo, se ha comprobado que las motoneuronas del recto medial reciben inhibición de manera polisináptica a través del nervio vestibular (Baker y Highstein, 1978) y del colículo superior (Grantyn y Berthoz, 1977) contralaterales. Se ha propuesto que estas aferencias pudieran ser el origen de las terminaciones GABAérgicas sobre las motoneuronas del recto medial (de la Cruz y col., 1992).

1.4.2.3. Otras aferencias

Núcleo prepositus hipoglossi: ubicado en el suelo del cuarto ventrículo, caudal al NMOE y rostral al hipogloso, envía proyecciones bilaterales a los núcleos oculomotores, principalmente al NMOE contralateral y a las motoneuronas del recto medial homolaterales a través del FLM (Graf y col., 2002; McCrea, 1988; McCrea y Baker, 1985). La naturaleza de esta última proyección aún no se conoce, aunque la estimulación del núcleo *prepositus hipoglossi* produce potenciales sinápticos inhibidores en la subdivisión del recto medial homolateral (López-Barneo y col., 1981; McCrea, 1988).

Área supraoculomotora e interneuronas del NMOC: constituida por células que se encuentran formando parte de la sustancia gris periacueductal dorsal al NMOC o dispersas por todo el núcleo, respectivamente, (de la Cruz y col., 1992, 1998; May y col., 1987) y que se activan antidrómicamente desde la subdivisión del recto medial (Zhang y col., 1991; Zhang y col., 1992), contactando monosinápticamente con dichas motoneuronas (Mays y Porter, 1984). Representan el control premotor de los movimientos de vergencia (Bohlen y col., 2015, 2017; Judge y Cumming, 1986; Mays y Porter, 1984; Mays y col., 1986; Zhang y col., 1992).

1.5. Movimientos oculares

Los movimientos oculares pueden dividirse en diferentes tipos, cada uno de los cuales realiza una función específica, además de poseer un sustrato anatómico y una organización funcional relativamente distintas. Aun así, los circuitos neuronales que desencadenan los diferentes tipos de movimiento están interconectados entre sí, convergiendo a nivel de la neurona motora. Existen seis tipos de movimientos oculares: sacádicos, fijaciones, movimientos de seguimiento, vergencia, y los reflejos vestibulo-ocular y optocinético. Todos ellos tienen como objetivo principal estabilizar la imagen del campo visual en la retina, manteniendo la agudeza visual, para evitar así que la visión sea borrosa.

1.5.1. Movimientos sacádicos

Los sacádicos son desplazamientos rápidos del globo ocular en la órbita hacia una nueva posición para centrar en la retina imágenes de interés que se encuentran en la periferia del campo visual. Son movimientos característicos de animales con fovea (como en primates), que es la zona de la retina con mayor agudeza visual, o con especializaciones retinianas equivalentes como el *area centralis* del gato. Durante los movimientos sacádicos, ambos ojos se mueven de forma conjugada, es decir, cada ojo se mueve con la misma amplitud y velocidad (Figura 6A, marcados en rojo). Son movimientos de tipo balístico: una vez iniciados se dirigen irremisiblemente hacia su diana, y van seguidos de una fijación, un periodo de tiempo donde el ojo está relativamente estacionario. Los sacádicos se realizan de forma voluntaria durante la exploración visual del medio, con una frecuencia de 1-3 sacádicos/s, aunque dependerá del estado de alerta. La latencia de los movimientos sacádicos desde la aparición del blanco visual oscila entre 200 y 250 ms y su duración entre 15 y 100 ms, con una velocidad pico que puede alcanzar los 600 grados/s (Becker, 1989). La duración y velocidad de los sacádicos depende de la amplitud. Esta relación entre amplitud, velocidad pico y duración es conocida como la

“secuencia principal” (Bahill y col., 1975), cuya función es calcular automáticamente los parámetros del sacádico (Harris y Wolpert, 2006).

Los movimientos sacádicos contienen tres componentes diferentes que pueden diferenciarse en el disparo de la motoneurona: pulso, caída post-sacádica y paso, que corresponden con un patrón de disparo tónico-fásico (Coubard, 2013). El pulso es el brote del disparo neuronal que genera la fuerza necesaria para mover el ojo, contrarrestando la resistencia inherente a la viscosidad del ojo en los tejidos orbitales, y se corresponde con una señal pura de velocidad (fásica). La caída post-sacádica, reducción brusca de la tasa de disparo, entre el pulso y el paso, es necesaria para neutralizar la constante de tiempo larga de la planta oculomotora (tejidos orbitales y musculares del ojo). Finalmente, el paso es el disparo neuronal necesario para mantener el ojo en la nueva posición, venciendo a las fuerzas elásticas de la planta oculomotora. Es una señal de posición (tónica) que se corresponde con la fijación ocular mantenida y estable tras la caída post-sacádica (Collins y col., 1975; Miller y Robins, 1992).

La generación y control de los movimientos sacádicos en el plano horizontal es producida por un complejo de neuronas premotoras localizadas en diferentes estructuras. Se ha demostrado por estudios de lesión, estimulación selectiva o registro unitario (Büttner-Ennever, 2008; Escudero y Delgado-García, 1988; Fuchs y col., 1985) que la formación reticular pontina paramediana (FRPP), localizada rostral al NMOE, y la formación reticular ponto-bulbar (FRPB), localizada caudal y ventral al NMOE, son fundamentales para la generación de los sacádicos horizontales. Ambas estructuras parecen ser las encargadas de producir la señal fásica durante los movimientos sacádicos. Así, la señal de velocidad es generada y controlada por neuronas de brote excitador (NBEs) localizadas en la FRPP, o bien neuronas de brote inhibitorio (NBIs) localizadas en la FRPB. Las NBEs contactan con motoneuronas y neuronas internucleares del NMOE homolaterales, y por lo tanto son fundamentales para la generación de movimientos oculares sacádicos hacia el lado homolateral (Fuchs y col., 1985; Strassman y col., 1986a). Por otra parte, las NBIs contactan con neuronas abductoras contralaterales, llevando señales inhibitorias al músculo antagonista (Fuchs y col., 1985; Strassman y col., 1986b). Además, tanto las NBEs como las NBIs están bajo el control inhibitorio monosináptico de las neuronas de pausa (Furuya y Markham, 1982). Las neuronas de pausa, también llamadas neuronas omnipausa, forman una red neuronal que se localiza en el núcleo del rafe pontino o *interpositus*, a nivel de la FRPP y que se extiende a ambos lados de las raíces descendentes del VI par (Büttner-Ennever y col., 1988). Estas células descargan a alta frecuencia durante las fijaciones oculares y detienen su disparo durante la ejecución del sacádico (Fuchs y col., 1985; Furuya y Markham, 1982). Además, hay estructuras superiores implicadas en el control premotor de los sacádicos horizontales a

nivel del colículo superior, corteza frontal y posterior, tálamo y cerebelo, que proyectan de forma polisináptica a través de las neuronas de la formación reticular, que a su vez contactan con las neuronas oculomotoras (Izawa y col., 1999; Leichnetz y Goldberg, 1988; Lynch y Tian, 2006). Por su parte, la señal fásica para producir sacádicos verticales y movimientos torsionales se origina en el núcleo intersticial rostral del FLM (Bhidadyasiri y col., 2000; Büttner-Ennever, 2008; King y Fuchs, 1979).

1.5.2. Fijaciones oculares

Tras un movimiento sacádico, los ojos mantienen su posición estable, con el objetivo de fijar en la fóvea el objeto de interés y reunir información visual útil del medio. Durante la fijación, la visión periférica es usada para determinar la localización de la próxima fijación. Aunque durante las fijaciones no hay desplazamiento de la posición ocular, ya que la velocidad del ojo es cero, se considera un tipo de movimiento ocular (Figura 6A, trazos azules). Sin embargo, el ojo no está completamente estático durante las fijaciones, ya que existen microsacádicos, derivas y temblores, cuya función es reducir la adaptación neural y evitar la desaparición de la imagen visual (Martinez-Conde y col., 2004). Durante las fijaciones se requiere de una fuerza sostenida necesaria para vencer la elasticidad de la planta oculomotora, esto es, una señal de posición tónica que mantenga al ojo estacionario. Durante las fijaciones, las motoneuronas oculomotoras mantienen tasas tónicas de disparo proporcionales a la posición del ojo en la órbita.

Existe un sistema activo capaz de transformar las órdenes de las neuronas premotoras de la formación reticular que codifican velocidad, en señales de posición que lleguen a las motoneuronas extraoculares. Las neuronas que realizan esta operación se conocen como “integradores neuronales”. Existen diferentes estructuras implicadas en la integración de las señales de velocidad a posición en el plano horizontal. Así, se ha demostrado que los núcleos *prepositus hypoglossi* (Cannon y Robinson, 1987; Moschovakis y col., 1996), NVM (Scudder y col., 2002), el flóculo del cerebelo (Fukushima y col., 1992) y algunas neuronas del tracto paramediano (Nakamagoe y col., 2000) son esenciales para mantener la posición ocular tras un sacádico. Sin embargo, por experimentos de lesión y registro neuronal, se ha determinado que la estructura principal que funciona como integrador de posición horizontal es el núcleo *prepositus hypoglossi* (Delgado-García y col., 1989; Escudero y Delgado-García, 1988; Escudero y col., 1992). El integrador de la señal fásica a tónica para los planos verticales y torsionales se encuentra en la formación reticular del mesencéfalo, en un núcleo bien delimitado y próximo al FLM, el núcleo intersticial de Cajal (Fukushima y col., 1992).

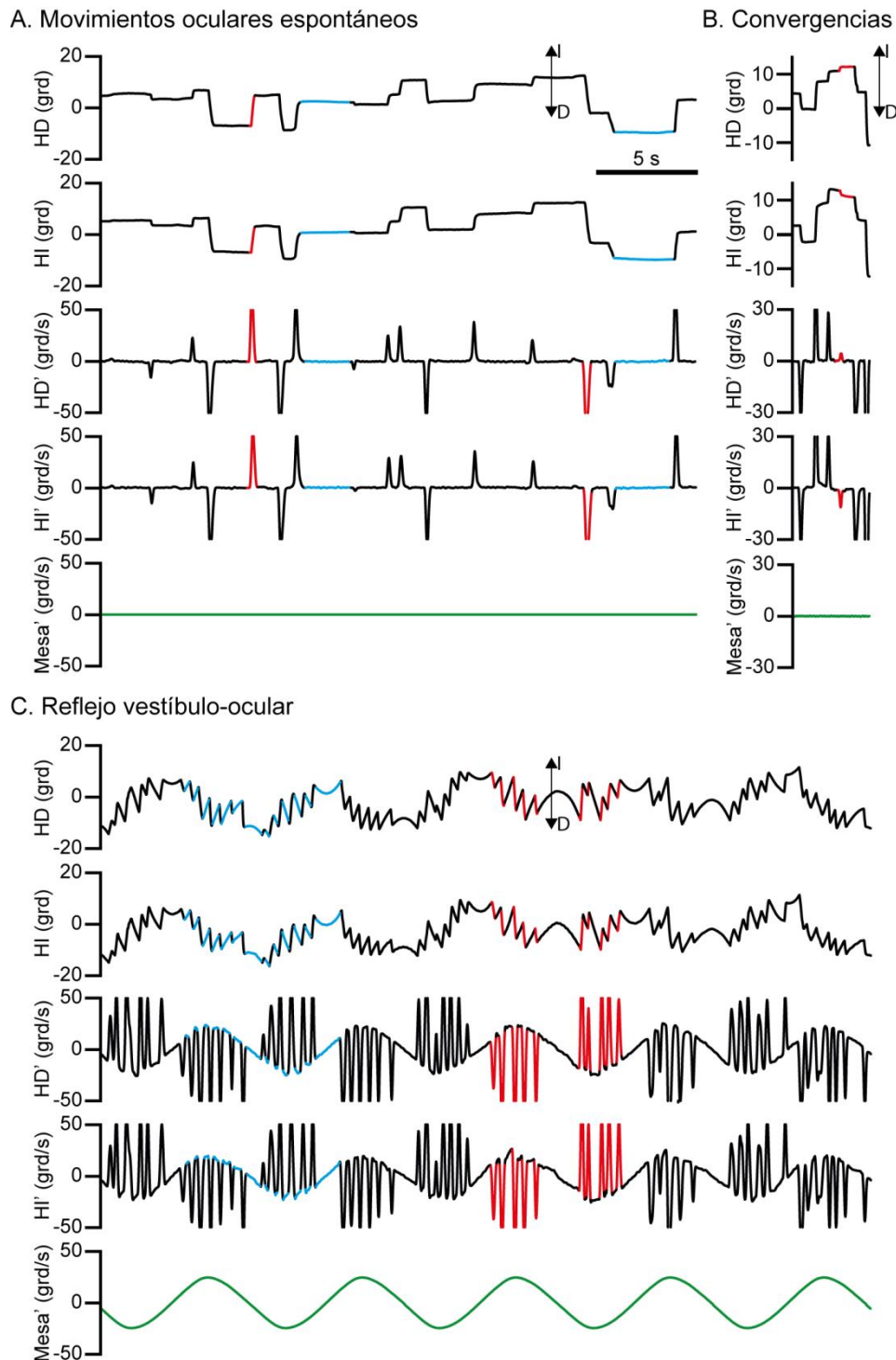


Figura 6. Movimientos oculares espontáneos e inducidos por estimulación vestibular. En cada panel se ilustra, de arriba hacia abajo, la posición del ojo derecho (HD) y del ojo izquierdo (HI), así como la velocidad ocular en el plano horizontal, (HD' y HI') y la velocidad de la mesa de registro (Mesa'). Los trazos hacia arriba y hacia abajo corresponden a desplazamientos de los ojos a izquierda (I) y derecha (D), respectivamente. **A:** Movimientos oculares espontáneos donde se señalan en color los sacádicos (en rojo) y las fijaciones (en azul). **B:** Se ilustra un ejemplo de convergencia ocular (en rojo). **C:** Movimientos oculares durante el reflejo vestibulo-ocular, donde se señalan ejemplos de fases rápidas (en rojo) y lentas (en azul).

1.5.3. Reflejo vestibulo-ocular

El reflejo vestibulo-ocular es un reflejo de tipo compensatorio, que estabiliza la imagen en la retina durante desplazamientos rotatorios de la cabeza, produciendo movimientos de los ojos con la misma velocidad pero en dirección opuesta a los de la cabeza (Figura 6C). Dependiendo de la frecuencia, velocidad y amplitud de rotación de la cabeza, el reflejo vestibulo-ocular puede tener una o dos fases bien diferenciadas. Si la frecuencia del movimiento rotacional de la cabeza es alta el reflejo consta de una fase lenta y compensatoria, donde los ojos se mueven a igual velocidad pero en sentido opuesto a la cabeza. A frecuencias bajas y amplitudes altas de estimulación, el reflejo desencadena una fase lenta y compensatoria (Figura 6C, líneas azules) y otra rápida no compensatoria dirigida en la misma dirección que la rotación de la cabeza, que centra al ojo en la órbita (Figura 6C, líneas rojas). El conjunto de fases lentas y rápidas que ocurren durante el reflejo se denomina nistagmo vestibular.

El reflejo vestibulo-ocular usa información sensorial periférica, proveniente de los canales semicirculares y de los órganos otolíticos del oído interno, para generar el movimiento compensatorio de los ojos en respuesta a desplazamientos de la cabeza en las tres direcciones cartesianas del espacio. Existen tres canales semicirculares (horizontal, anterior y posterior) simétricamente localizados a ambos lados de la cabeza. Los canales semicirculares detectan la aceleración angular originada por la rotación de la cabeza, que activa a las células ciliares por el desplazamiento de la endolinfa que contienen (Fernandez y Goldberg, 1971). Por otro lado, los órganos otolíticos (utrículo y sáculo) detectan aceleración lineal de la cabeza. Así, a nivel sensorial podemos distinguir dos componentes, el reflejo vestibulo-ocular rotacional, a nivel de los canales semicirculares, y el translacional, a nivel de los otolitos (Cullen y Van Horn, 2011). Las señales provenientes de las células ciliadas sensoriales se transmiten a neuronas vestibulares de primer orden, cuyo soma se encuentra en el ganglio de Scarpa. De ahí la información se envía hasta el complejo vestibular del tronco del encéfalo por el VIII par craneal (Straka y Dieringer, 2004). La señal que reciben las células vestibulares se combina con información somatosensorial y propioceptiva procedente de estructuras superiores, las cuales son fundamentales para el correcto funcionamiento del reflejo (Cullen y Van Horn, 2011). Finalmente, las neuronas del complejo vestibular establecen sinapsis directamente con las motoneuronas extraoculares. Las neuronas abductoras reciben aferencias excitadoras del NVM contralateral durante la rotación de la cabeza en el plano horizontal. Las aferencias inhibitorias proceden del complejo vestibular homolateral. Las motoneuronas del recto medial reciben entradas excitadoras del NVL del lado homolateral y carecen de inhibición vestibular disináptica.

La organización del reflejo vestíbulo-ocular sigue un esquema simple que se ajusta a un arco trineuronal bilateral y recíproco formado por las neuronas sensoriales primarias del ganglio de Scarpa, las neuronas del complejo vestibular y las motoneuronas oculomotoras.

1.5.4. Reflejo optocinético

El reflejo optocinético origina movimientos compensatorios lentos de los ojos, cuando la cabeza permanece estacionaria en el espacio y es el campo visual el que gira en torno al individuo. Consta de dos fases, una fase lenta y compensatoria en el mismo sentido y con la misma velocidad que el desplazamiento del campo visual, con una latencia de 100 a 200 ms tras el inicio del estímulo, y una fase rápida no compensatoria en dirección opuesta al movimiento del medio, que resitúa a los ojos en la posición central de la órbita. La combinación de fases lentas y rápidas durante el reflejo optocinético se denomina nistagmo optocinético (Büttner y Kremmyda, 2007). Este reflejo complementa al reflejo vestíbulo-ocular, fundamentalmente en el rango de frecuencias bajas, donde es poco operativo debido a la aceleración del estímulo (Robinson, 1981), y a diferencia de éste, utiliza información visual más que del aparato vestibular (Cullen y Van Horn, 2011).

Durante las fases lentas del reflejo optocinético, podemos distinguir dos componentes, un primer componente directo, que ocurre directamente después del inicio del estímulo optocinético y relacionado con la respuesta de seguimiento ocular; y un segundo componente indirecto, que funciona como un almacén de información de velocidad del ojo (Cohen y col., 1977; Miles, 1998), produciendo un incremento gradual en la velocidad de las fases lentas cuando la estimulación optocinética persiste en el tiempo.

La información sensitiva necesaria para desencadenar la fase lenta y compensatoria del reflejo optocinético procede de las células ganglionares de la retina que poseen grandes campos receptores. Las fibras de la retina proyectan a nivel del mesencéfalo, hasta los núcleos del sistema óptico accesorio (Gioli y col., 2006) y hacia el complejo nuclear pretectal, localizados en la unión entre el mesencéfalo y el diencéfalo (Simpson y col., 1988). Además, estos núcleos reciben información visual procedente de la corteza (Distler y col., 2002). Los núcleos del sistema óptico accesorio y del complejo pretectal proyectan hacia áreas del tronco del encéfalo más caudales, principalmente a nivel de los núcleos pontinos, del núcleo reticular tegmental pontino, la oliva inferior, el núcleo *prepositus hipoglossi*, y el NVM (Cullen y Van Horn, 2011; Mustari y col., 1994). Las neuronas de los núcleos pontinos y la oliva inferior dirigen aferencias al flóculo del cerebelo, que a su vez proyecta sobre los núcleos vestibulares (Distler y col., 2002; Ono y col., 2005). Finalmente, las neuronas vestibulares y del núcleo *prepositus hipoglossi* llevan

información directa hasta las motoneuronas del sistema oculomotor. Las fases rápidas durante el reflejo optocinético son producidas por las mismas neuronas de brote a nivel de la formación reticular del tronco del encéfalo que generan los movimientos sacádicos.

En ausencia de estímulos visuales, por ejemplo en oscuridad, la estimulación optocinética continúa, gracias al componente indirecto que actúa como un almacén de velocidad, generando lo que se conoce como post-nistagmo optocinético, y que se debe a cambios en la sensibilidad a la velocidad a nivel de las neuronas vestibulares (Boyle y col., 1985; Büttner y Kremmyda, 2007). En situaciones reales, donde la estimulación vestibular y optocinética ocurren simultáneamente, las aferencias sensitivas vestibulares y visuales convergen a nivel de las neuronas del complejo vestibular, donde la información es integrada a nivel de cada célula, originando así respuestas compensatorias robustas, estabilizando y manteniendo la agudeza visual durante los movimientos del ojo (Cullen y Van Horn, 2011).

1.5.5. Movimientos de seguimiento

Los movimientos de seguimiento son necesarios para mantener una imagen clara y estacionaria sobre la retina de un blanco visual que se desplaza lentamente sobre un entorno visual fijo. El objetivo principal es mantener una velocidad de seguimiento del ojo cercana a la velocidad de desplazamiento del objeto de interés, minimizando el deterioro de la imagen sobre la retina. Este tipo de movimiento se ha descrito únicamente en animales foveados o con un área equivalente (Büttner y Kremmyda, 2007). Se trata de una tarea voluntaria que depende del grado de atención. La latencia con la que se inician los movimientos de seguimiento es de 100 a 130 ms (Robinson, 1965), y aunque son considerados movimientos lentos pueden alcanzar velocidades de 100 grados/s en primates (Lisberger y col., 1981; Simons y Büttner, 1985); sin embargo el gato, dotado con *area centralis* y no con fovea, solo puede llegar hasta los 20 grados/s (Robinson, 1981). La iniciación de este tipo de movimientos depende principalmente de señales visuales, mientras que el mantenimiento del desplazamiento depende de una señal de velocidad (Morris y Lisberger, 1987).

En circunstancias normales, el seguimiento de un objeto en movimiento va acompañado de movimientos de la cabeza. El movimiento de la cabeza induce el reflejo vestíbulo-ocular, por lo que es necesario cancelarlo durante los movimientos de seguimiento. Así, en estudios recientes se ha sugerido que el SNC genera señales para cancelar este reflejo (Belton y McCrea, 2000; Fukushima y col., 1999).

Los movimientos de seguimiento son el resultado de un complejo proceso de transformación visuo-oculomotora, que involucra diversas estructuras a nivel de la corteza, cerebelo y tronco del encéfalo (Krauzlis, 2004; Thier e Ilg, 2005). Neuronas corticales premotoras del córtex parietotemporal que codifican la velocidad y la dirección del movimiento visual (Fukushima y col., 2005; Maunsell y Van Essen, 1983) proyectan sobre diversos núcleos pontinos, desde donde la señal es enviada al flóculo del cerebelo (Distler y col., 2002; Ono y col., 2005). Las neuronas del cerebelo contactan con neuronas vestibulares del NVM y del grupo Y (Chubb y Fuchs, 1982; Roy y Cullen, 2003). Finalmente, las células vestibulares proyectan directamente sobre los núcleos del sistema oculomotor que contienen las motoneuronas extraoculares para el desplazamiento del ojo (Lisberger y col., 1987). Los movimientos de seguimiento y los sacádicos son dos tipos de movimientos voluntarios que han sido considerados sistemas bien diferenciados. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que ambos tipos de desplazamientos comparten redes neuronales similares tanto a nivel cortical como subcortical (Krauzlis, 2005).

1.5.6. Movimientos de vergencia

Los movimientos de vergencia son desplazamientos disyuntivos de la mirada: ambos ojos se mueven en dirección opuesta, y son producidos cuando un objeto de interés se acerca o aleja del observador, con el fin de alinear la imagen en ambas fóveas. Si el objeto de interés se acerca, ambos ojos se dirigirán hacia una posición nasal, originando movimientos de convergencia (Figura 6B); mientras que si la diana se aleja, los ojos se separarán hacia posiciones laterales, dando lugar a movimientos de divergencia. La convergencia se lleva a cabo mediante la contracción y relajación simultánea de los músculos recto medial y recto lateral, respectivamente, en cada ojo. Por otra parte, la divergencia ocurre por la contracción de los músculos recto laterales (Hejtmancik y col., 2017). Los movimientos de vergencia, en general, son de pequeña amplitud (menos de 5 grados) y lentos, llevando hasta un segundo su ejecución. Su latencia oscila de 150 a 200 ms pero pueden ser muchos más rápidos cuando se realizan en conjunción con movimientos sacádicos (van Leeuwen y col., 1998). La sensación de profundidad es creada por el sistema visual cuando hay una disparidad retinal entre ambos ojos. Este mismo estímulo sirve al sistema de vergencia para controlar lo que se conoce como movimientos fusionados de vergencia, que cursan además con la acomodación del cristalino y el reflejo pupilar.

En el macaco se ha descrito que existen neuronas premotoras para los movimientos de vergencia localizadas a nivel de la formación reticular mesencefálica, situadas dorsales y

dorsolaterales al NMOC (Judge y Cumming, 1986; Mays y Porter, 1984; Mays y col., 1986; Zhang y col., 1992). Estas neuronas se activan antidrómicamente desde la subdivisión recto medial del NMOC (Zhang y col., 1991; Zhang y col., 1992), incrementando su patrón de disparo neuronal durante movimientos convergentes (neuronas convergentes), o disminuyéndolo (neuronas divergentes). Además, algunas de estas células codifican el ángulo de vergencia (neuronas tónicas), otras codifican la velocidad del movimiento (neuronas fásicas) y otras ambas señales, combinando información de velocidad y posición durante los movimientos de vergencia (Mays y Porter, 1984; Mays y col., 1986; Zhang y col., 1992). Como es de esperar, estas neuronas no responden a movimientos conjugados de los ojos.

Aunque previamente se sugirió que las neuronas internucleares del NMOE podrían proveer de la señal de vergencia a la población de motoneuronas del recto medial, esta idea fue refutada, ya que se demostró que estas células llevan una señal inapropiada para la vergencia (Gamlin y col., 1989a). Menos conocida aún es la estructura premotora que lleva la información de vergencia a las motoneuronas del NMOE. Se sugirió la posibilidad de que fueran las interneuronas del NMOC, cuyos axones proyectan a través del FLM contralateral (de la Cruz y col., 1992; Maciewicz y col., 1975), aunque otros estudios han demostrado que éstas células proyectan a las neuronas motoras información para movimientos conjugados horizontales, pero no para movimientos de vergencia (Clendaniel y Mays, 1994). Se sabe que hay un control premotor a nivel de la corteza, así como a nivel cerebelar, de la información de vergencia que llega a las motoneuronas del NMOE y del NMOC (Gamlin y col., 1996; Zhang y Gamlin, 1998), aunque no está del todo claro como sucede.

Las motoneuronas del recto medial y lateral reciben señales de vergencia y de movimientos oculares conjugados, que se generan de manera independiente y se combinan a nivel de las mismas; de modo que ciertas células juegan un papel más importante que otras en vergencia (Mays y Porter, 1984). En el caso particular del NMOC, en estudios recientes en el mono, se ha determinado que las motoneuronas del subgrupo C, localizadas dorso-rostralmente en el núcleo oculomotor, podrían ser fundamentales para llevar las órdenes motoras al músculo recto medial durante movimientos convergentes (Bohlen y col., 2015, 2017; Büttner-Ennever y col., 1996, 2001).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo ha sido la caracterización de la respuesta de las motoneuronas del recto medial tras la eliminación selectiva de sus dos principales entradas sinápticas, el FLM y el TAD, analizando tanto las propiedades de disparo como las aferencias sinápticas. Además, se ha querido conocer el desarrollo de posibles mecanismos plásticos tras la lesión, así como la respuesta trófica de las motoneuronas deaferentadas. Finalmente, y dada la particular resistencia de las motoneuronas oculomotoras a la neurodegeneración y su bien documentada dependencia trófica, se planteó como segundo objetivo principal conocer el patrón de distribución de neurotrofinas en el sistema oculomotor.

En concreto, se han pretendido alcanzar los siguientes objetivos:

- 1.** Caracterizar la respuesta fisiológica de las neuronas motoras del recto medial a la deaferentación selectiva, producida por la sección del TAD o del FLM.
- 2.** Comprobar que ambas proyecciones conducen sus terminales axónicos hasta las motoneuronas del recto medial, así como su localización y extensión a través del tronco del encéfalo.
- 3.** Demostrar la idoneidad del marcaje frente a calretinina para la identificación de las aferencias vestibulares y del NMOE sobre las motoneuronas del recto medial.
- 4.** Analizar la cobertura sináptica a las motoneuronas del recto medial en control y a corto y largo plazo tras la sección unilateral del TAD o del FLM.
- 5.** Determinar el curso temporal a corto plazo de la pérdida de los terminales sinápticos tras la deaferentación selectiva.
- 6.** Investigar posibles mecanismos de compensación morfo-funcional tras la lesión, estudiando la expresión de la proteína GAP-43 y compararla con la situación control.

- 7.** Estudiar la presencia de factores neurotróficos en las motoneuronas deaferentadas, con el fin comprender los mecanismos compensatorios observados.

- 8.** Determinar el patrón de distribución de las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NGF en las motoneuronas y la musculatura del sistema oculomotor de la rata adulta y compararlo con el que presentan otros sistemas motores (facial e hipogloso).

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales de experimentación

Los experimentos se llevaron a cabo en hembras de gato (*Felis catus*) adulto de raza europea con un peso aproximado de 2-3 kg, y en machos y hembras de ratas (*Rattus norvegicus*) adultas de la cepa Wistar con un peso aproximado de 250-300 g, obtenidos de establecimientos autorizados para la producción y distribución de animales de laboratorio (Servicio de Producción Animal de la Universidad de Córdoba para gatos y el Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla, CPEA, para ratas). Todos los procedimientos realizados siguieron la normativa de la Unión Europea (2010/63/EU) y la legislación española vigente (R. D. 53/2013/BOE 34/11370-421) que regulan el uso y cuidado de los animales de experimentación, contando además con la autorización del Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla.

En el presente trabajo de investigación se utilizaron 17 gatos y 36 ratas, distribuidos de la siguiente manera:

- **Animales para procedimientos de marcaje anterógrado para microscopía óptica convencional:** Se inyectó biocitina como marcador anterógrado en un total de cuatro gatos controles, que recibieron la inyección en el NMOE ($n = 2$) o en el NVL ($n = 2$), para la identificación de las aferencias a las motoneuronas del recto medial del NMOC.
- **Animales para el registro electrofisiológico de las neuronas del NVL ventral:** Se realizó la preparación quirúrgica de dos gatos para el registro electrofisiológico de las neuronas del NVL que proyectan a la subdivisión del recto medial. Se registró la actividad neuronal de estas células durante movimientos oculares espontáneos y durante el reflejo vestíbulo-ocular en la situación control.
- **Animales para registro electrofisiológico crónico y estudios a largo plazo con procedimientos inmunohistoquímicos y microscopía confocal:** Se realizó la preparación quirúrgica de siete gatos para el registro electrofisiológico crónico, a los que se les seccionó unilateralmente el TAD ($n = 4$) o el FLM ($n = 3$). Estos animales se utilizaron para el registro de los movimientos oculares y de la actividad unitaria de neuronas motoras del recto medial del NMOC durante movimientos tanto espontáneos como inducidos por estimulación vestibular en la situación control y tras la deaferentación

selectiva. Además, se desarrolló un estudio a largo plazo (más de 25 días y hasta 2 meses tras la lesión) de la cobertura sináptica sobre las motoneuronas del recto medial, con anticuerpos dirigidos contra sinaptofisina o calretinina. A continuación, se estudió la expresión de la proteína GAP-43, marcador de crecimiento axonal, en el neuropilo de la subdivisión recto medial. Finalmente, se determinó la presencia de factores tróficos de la familia de las neurotrofinas (BDNF, NT-3 y NGF) en el soma de las motoneuronas del recto medial. El lado no lesionado se consideró control.

- **Animales para estudios a corto plazo con procedimientos inmunohistoquímicos y microscopía confocal:** En paralelo, se realizó otro estudio de la cobertura sináptica de las motoneuronas del recto medial del NMOC en gatos, 72 horas tras la sección unilateral del TAD ($n = 2$) o bien del FLM ($n = 2$). Igualmente, se determinó la expresión de GAP-43 en el neuropilo así como de las neurotrofinas en el soma de las neuronas motoras del recto medial. Todo ello, se desarrolló siguiendo el mismo procedimiento usado en el estudio a largo plazo. Estos animales no se sometieron a registro crónico. Además, en un total de 23 ratas adultas, se realizó otro estudio de la sinaptología a la subdivisión recto medial tras la sección del TAD ($n = 12$) o del FLM ($n = 11$), 24 ($n = 4$ y $n = 4$, respectivamente), 48 ($n = 4$ y $n = 3$, respectivamente), o 96 horas ($n = 4$ y $n = 4$, respectivamente) tras la lesión.
- **Animales para procedimientos inmunohistoquímicos de microscopía de fluorescencia y Western blot:** Se utilizaron ratas control ($n = 7$) para determinar la presencia de neurotrofinas (BDNF, NT-3 y NGF) en el soma de las motoneuronas del sistema oculomotor, y se comparó con la distribución de estos factores en otros núcleos del tronco del encéfalo, núcleo motor del facial y núcleo hipogloso. Además, se analizó el contenido de dichos factores en la musculatura extraocular (inervados por las motoneuronas del NMOC, NMOT y NMOE) así como en el músculo buccinador (inervado por el nervio facial) y la lengua (inervada por neuronas motoras del núcleo hipogloso) de ratas controles ($n = 6$).

3.2. Preparación quirúrgica de los animales para el registro crónico extracelular

Los animales se prepararon quirúrgicamente para el registro crónico extracelular de la actividad electrofisiológica de las neuronas motoras del NMOC. Para ello, tras un periodo de ayuno de 12 horas, se anestesiaron mediante la administración intramuscular (i.m.) de clorhidrato de ketamina (20 mg/kg; Merial Laboratorios, Barcelona, España) mezclado con xilacina (0,5 mg/kg; KVP Pharma, Kiel, Alemania), previa inyección de una solución parasimpaticolítica (sulfato de atropina, 0,5 mg/kg, i.m.; Braun, Barcelona, España) para reducir los reflejos vagales. Los animales, una vez anestesiados, se fijaron al aparato estereotáxico (David Kopf Instruments 1204, Tujunga, California, EEUU) mediante las barras de oído y se mantuvo estable la temperatura corporal a 38-39°C mediante una manta térmica. Se rasuró y desinfectó la piel de la cabeza y se practicó una incisión longitudinal sobre la línea media desde el borde anterior frontal hasta la sutura lambdoidal, eliminándose las inserciones musculares subyacentes. Posteriormente, y siguiendo las coordenadas estereotáxicas en los ejes antero-posterior y medio-lateral, se marcaron dos puntos de referencia sobre la superficie del cráneo con un rotulador indeleble, que sirvieron de guía para la localización del NMOC y del NMOE según las coordenadas del atlas de Berman (1968). Utilizando un torno de dentista, se practicaron dos ventanas cuadradas de unos 5 mm de lado cada una, una sobre el hueso parietal izquierdo y otra centrada sobre el hueso occipital, para permitir el acceso al NMOC y NMOE, respectivamente. En el borde anterior de ambas ventanas de registro, coincidiendo con el punto de referencia señalado con rotulador, se fijaron unas agujas de acero inoxidable con cemento dental (Duralay, Worth, Illinois, EEUU) que sirvieron de referencia estereotáxica para la localización del NMOC y NMOE, respectivamente.

Posteriormente, se implantaron electrodos bipolares de estimulación intracraneal en la salida del III par craneal, de forma bilateral, así como en el VI par craneal derecho, para la identificación antidrómica de las motoneuronas del NMOC y del NMOE, respectivamente (Figura 7, III y VI par). Los electrodos se fabricaron con alambre de plata barnizado, de unos 200 µm de diámetro, a los que se les retiró el barniz aislante en los 0,5 mm finales (Figura 8C, Narishige E-1, Tokyo, Japón). La ubicación de los electrodos se determinó siguiendo un atlas estereotáxico (Berman, 1968). Las coordenadas para la localización del III par craneal fueron 6 mm posterior y 2 mm lateral al cero estereotáxico y a 23-24 mm de profundidad desde la superficie del cerebro. En el caso del electrodo situado en el VI par craneal, las coordenadas fueron 1 mm posterior y 3,5 mm lateral al cero y a 26-27 mm de profundidad (Figura 8A). La localización dorso-ventral

exacta fue aquella en la que se requirió un menor umbral de estimulación eléctrica para conseguir el movimiento de aducción del ojo homolateral, en el caso del III par craneal, o de abducción en el caso del electrodo situado en el VI par craneal (pulsos cuadrados de 50 μ s a una frecuencia de 1 Hz y con una intensidad inferior a 0,1 mA).

Una vez implantados los electrodos, se atornillaron al cráneo 6 tornillos autorroscantes de acero inoxidable, que se utilizaron para la construcción y fijación de una torreta de cemento dental sobre la superficie del cráneo. Sujeto en el cemento se colocó un conector de 15 puertos que sirvió como conexión para la salida de la señal de los movimientos oculares y la entrada de las señales de estimulación. Además, se instaló en la torreta un sistema para la inmovilización de la cabeza del animal durante las sesiones de registro, que consistió en 3 tornillos de 35 mm de longitud y métrica 4, embebidos en la torreta de cemento, que permitieron la fijación de la cabeza del animal a la mesa de registro electrofisiológico (Figura 8B). La torreta de cemento dental se construyó respetando las ventanas de registro abiertas. Estas cámaras se cerraron asépticamente con una lámina circular de silicona, una gasa empapada en gentamicina (Cusí, Barcelona, España) y un cierre de plástico.

Para el registro de los movimientos oculares se implantó, en cada globo ocular del gato, una bobina de dos vueltas de alambre de acero inoxidable de 250 mm de diámetro (Figura 7, bobina), aislada con hilo de teflón (Cooner Wire, Chastworth, California, EEUU). La bobina se suturó a la esclerótica mediante 5 puntos de sutura realizados con hilo de seda del 6/0 (Laboratorios Aragó, Barcelona, España) y una aguja semicircular de sección circular. Los extremos de la bobina periocular se dirigieron subcutáneamente hacia el hueso frontal, donde se soldaron al conector implantado en la torreta.

Una vez finalizada la intervención quirúrgica, se aplicó una pomada antibiótica en la superficie corneal y en los bordes entre la torreta y la piel (gentamicina, Cusí). Además, se procedió a la hidratación de los animales con inyecciones subcutáneas de suero fisiológico (10 ml/kg, Laboratorios ERN, Barcelona, España) y de glucosado (10 ml/kg, Laboratorios Grifols, Barcelona, España). Durante el postoperatorio, se vigiló diariamente el estado del animal, prestando atención a la ingesta de alimento y agua, y se aplicó un tratamiento con antibióticos (0,04 ml/kg, i.m.; Fort Dodge Veterinaria, Girona, España) y analgésicos (0,3 mg/ml, i.m.; buprenorfina, Dechra, Skipton, Reino Unido) durante los primeros cinco días tras la operación. Además, se limpió la piel circundante a la torreta, los ojos y la zona periorbital con salino y antibióticos.

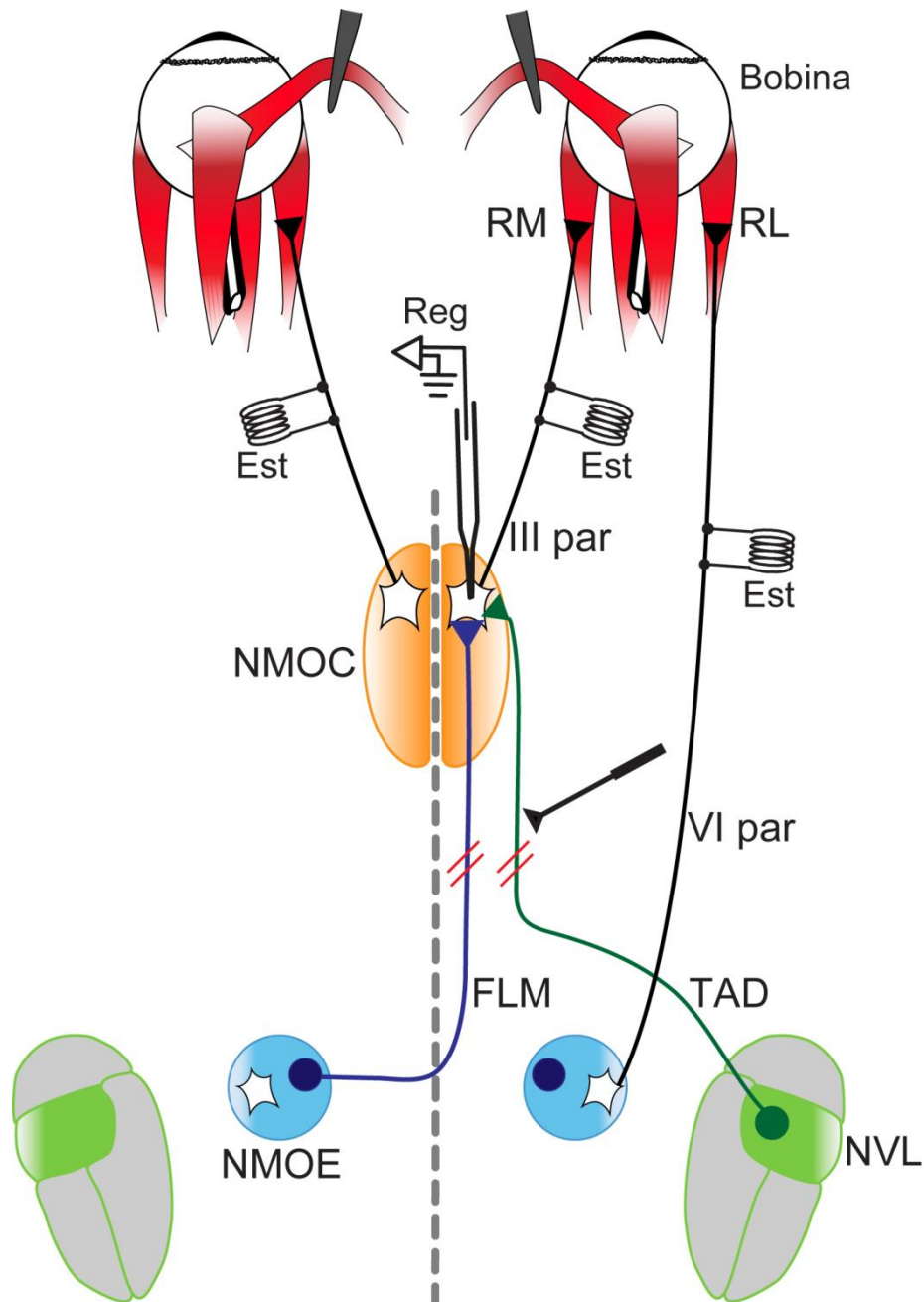


Figura 7. Diseño experimental para el registro de neuronas motoras del núcleo motor ocular común (NMOC). Diagrama simplificado del sistema oculomotor, con la localización de los núcleos y las conexiones implicadas en el estudio. El NMOC está constituido por diferentes poblaciones de motoneuronas que inervan la musculatura extraocular. La subdivisión del recto medial contiene neuronas motoras que inervan el músculo recto medial (RM) a través del III par craneal (III par). Estas motoneuronas reciben aferencias desde las neuronas internucleares del núcleo motor ocular externo (NMOE) contralateral a través del fascículo longitudinal medial (FLM) y de neuronas del núcleo vestibular lateral (NVL) homolateral a través del tracto ascendente de Deiters (TAD). Además, el NMOE contiene neuronas motoras que conectan con el músculo recto lateral (RL) a través del VI par craneal (VI par). Se llevó a cabo la deaferentación selectiva de las motoneuronas del recto medial mediante la sección unilateral del FLM o del TAD (líneas rojas paralelas). En el esquema también se representan el sitio de registro (Reg), las bobinas perioculares (Bobina) para el seguimiento de los movimientos oculares y los electrodos bipolares de estimulación implantados (Est).

3.3. Registros extracelulares unitarios

Finalizado el periodo post-operatorio de 15 días, comenzaron las sesiones de registro, cuya duración fue de 3-4 horas, en días alternos y hasta 2 meses tras la axotomía.

En las sesiones de registro el animal permaneció inmovilizado. Para ello se le introdujo en una bolsa de tela dejando la cabeza fuera, y tras permitirle adoptar una postura de reposo se le envolvió con vendas elásticas. Posteriormente, se situó al animal en una caja de metacrilato colocada dentro de la mesa de registro. La cabeza se fijó a la mesa por medio de los 3 tornillos implantados en la torreta, que se sujetaron a un sistema de barras metálicas dentro de la mesa de registro. El ángulo de inclinación de la cabeza del animal, una vez inmovilizado, fue de 22 grados hacia abajo. Con esta inclinación se aseguró la máxima estimulación de los canales semicirculares horizontales, con mínima intervención de los verticales, durante la rotación de la mesa de registro alrededor del eje vertical (Blanks y col., 1975).

Los movimientos oculares se registraron según la técnica del seguimiento electromagnético de la posición ocular (Fuchs y Robinson, 1966): La mesa de registro constaba de un marco cúbico de metacrilato rodeado por dos pares de bobinas situadas en los ejes vertical y horizontal, que generaban un campo electromagnético. Las bobinas perioculares implantadas en la esclerótica rotaban por el movimiento ocular dentro del campo electromagnético producido por las bobinas de la mesa, generando una diferencia de potencial con cada movimiento, que fue proporcional al ángulo de desplazamiento de la mirada. De esta manera, estableciendo una equivalencia voltio/grado, se pudieron registrar los movimientos oculares en los planos horizontal y vertical.

Durante la primera sesión de registro se calibraron los movimientos oculares. La calibración se efectuó rotando la mesa con un motor servocontrolado en el plano horizontal y en oscuridad, para inducir el reflejo vestibulo-ocular. La rotación de la mesa consistió en movimientos sinusoidales de amplitud comprendida entre ± 25 y ± 30 grados y frecuencia de 0,125 Hz. Dado que en estas circunstancias la ganancia del reflejo es 1 (Donaghy, 1980), se pudo determinar la equivalencia entre la diferencia de potencial registrada y los grados de desplazamiento ocular.

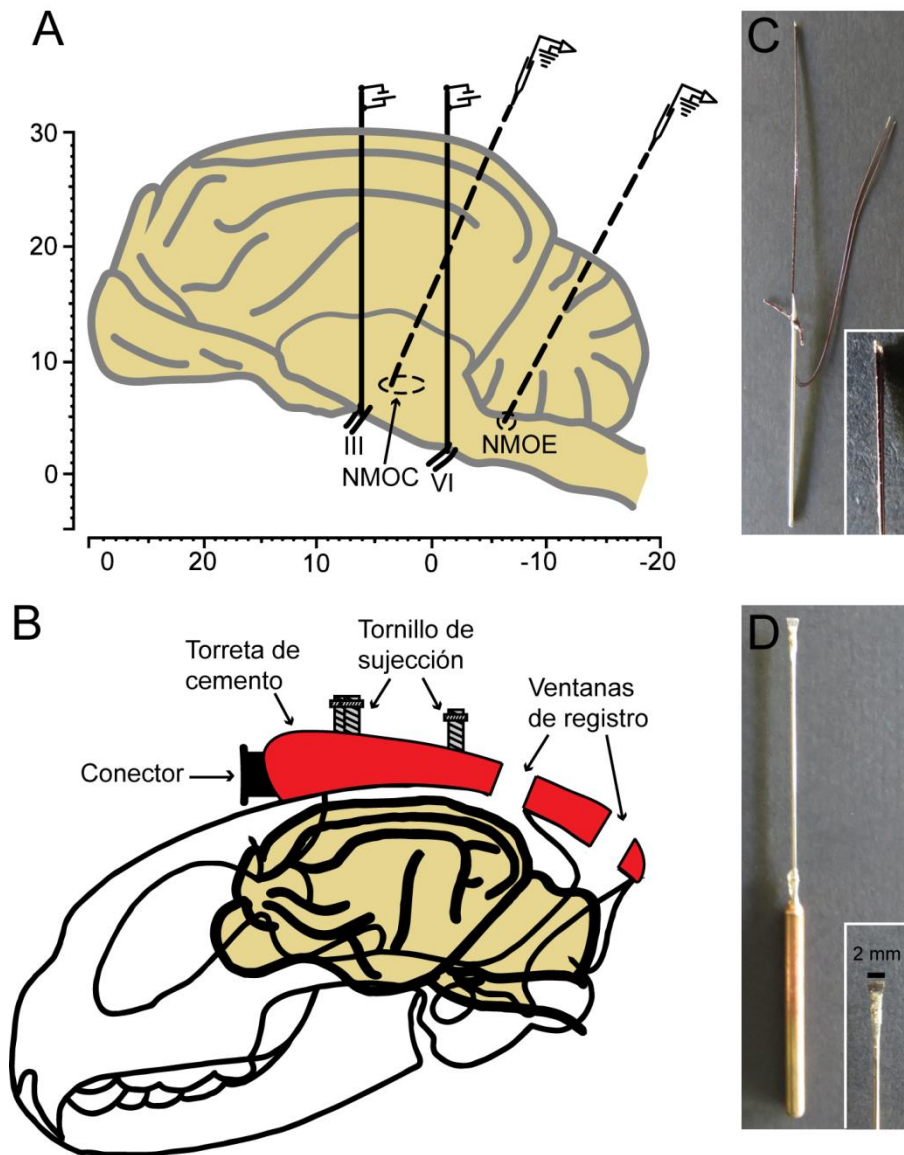


Figura 8. Preparación del animal para el registro crónico y lesión. **A:** Esquema del cerebro del gato en visión sagital donde se representa la localización de los electrodos de estimulación, implantados bilateralmente en el III par craneal (+6 mm anteroposterior, ± 2 mm lateral y 24 mm en profundidad), y unilateralmente en el VI par craneal derecho (-1 mm anteroposterior, -3,5 mm lateral y 27 mm en profundidad), según el atlas de Berman (1968). Además se ilustran los tractos de registro para localizar el núcleo motor ocular común (NMOC) y el núcleo motor ocular externo (NMOE), con una inclinación de 22 y 27 grados rostrales, respectivamente. Además, en el caso del NMOC la pipeta se movió 15 grados laterales (no ilustrado). **B:** Representación del cráneo del gato en visión lateral con la torreta construida con cemento dental en posición dorsal. Se ilustra el conector al cual se conectaron las bobinas perioculares y los electrodos bipolares de estimulación. También se representan los tornillos de sujeción para la fijación de la cabeza, así como las ventanas de registro para acceder al NMOC y NMOE durante las sesiones de registro. **C:** Imagen de un electrodo de estimulación intracraneal. En el recuadro se observa con detalle el extremo del mismo. **D:** Microcuchilla empleada para seccionar el TAD, con una hoja cortante de 2 mm de ancho. La microcuchilla empleada para seccionar el FLM tenía una anchura de 0,6 mm.

Al inicio de cada sesión de registro se abrió la cámara de registro del NMOC, retirando el sello que la cubría y eliminando cuidadosamente, bajo anestesia local (lidocaína 2%, Cusi), el tejido de granulación que recubría la región de la corteza que era visible desde la ventana, a través de la cual se pudo acceder con los electrodos de registro al NMOC.

Los electrodos de registro usados consistieron en micropipetas de vidrio obtenidas a partir de varillas de 3 mm de diámetro externo y pared de 0,5 mm de espesor (Pirex de Corning, Nueva York, EEUU), fabricados con un estirador de micropipetas (Narishige PE-2). Bajo un microscopio óptico se biseló la punta hasta obtener un diámetro de punta de 1-2 μm y una resistencia final de entre 1 y 5 M Ω . Las micropipetas se llenaron con una solución de NaCl 2 M y se fijaron a un micromanipulador (Narishige ME-7, modelo Cambera), para su aproximación al área de registro.

Las coordenadas estereotáxicas del NMOC son 4 mm rostral y 0,5 mm lateral al cero estereotáxico (Berman, 1968). Para localizar el NMOC, la micropipeta se movió, con la ayuda de un micromanipulador, hacia unas coordenadas previamente calculadas con la ayuda de un mapa, en el cual se dibujaron las coordenadas estereotáxicas del NMOC y la posición exacta de la ventana y la aguja de referencia con respecto al cero estereotáxico. Así, en cada sesión de registro, la micropipeta se desplazó, desde la aguja, hasta la distancia anteroposterior y mediolateral necesaria para alcanzar el NMOC, de acuerdo a la posición relativa de la aguja respecto al cero estereotáxico, dirigiéndose hasta 20-22 mm de profundidad desde la superficie, con un ángulo de inclinación anteroposterior total de 22-27 grados, y mediolateral de 15 grados (Figura 8A).

La localización final del NMOC se verificó al registrar el potencial de campo antidrómico producido al estimular eléctricamente el III par craneal homolateral al sitio de registro. Estos campos estuvieron compuestos por una pequeña onda positiva seguida de una onda negativa que aumentó de tamaño a medida que la micropipeta se aproximó al centro del núcleo (Lorente de Nó, 1947).

Los registros electrofisiológicos se realizaron en el NMOC derecho; la pipeta de registro se conectó a un preamplificador (Nex 1, Biomedical Engineering Co., Nueva York, EEUU) por medio de un electrodo de plata y desde ahí la señal llegó a un amplificador (Tektronix AM 502, Bearerton, Oregón, EEUU) acoplado capacitativamente para eliminar las bajas frecuencias, filtrándose con un ancho de banda comprendido entre 10 Hz y 10 KHz. Desde aquí la señal se dirigió hacia un audiomonitor (Cibertec, Madrid, España) y hacia un osciloscopio analógico de dos canales (ISO-tech, ISR622, Corby, Reino Unido), para la visualización de la señal registrada

on-line, a través de un discriminador de ventana (Cibertec, PV 125). Desde este punto la señal se envió hacia una tarjeta de adquisición analógico/digital (CED Power 1401, Cambridge, Reino Unido), a la cual también llegarían señales de movimiento de la mesa de registro y de las bobinas perioculares. La señal digitalizada se dirigió hasta un ordenador para la adquisición y almacenamiento de todas las señales (Figura 9).

Las motoneuronas del NMOC, en todas las situaciones experimentales, fueron identificadas mediante un test de colisión de la espiga antidrómica con la ortodrómica (de la Cruz y col., 1989; Delgado-García y col., 1986a). De esta manera, el test permite asegurar que la neurona registrada y la activada antidrómicamente son la misma. Para ello se estimuló eléctricamente desde el electrodo implantado en el nervio del III par craneal homolateral, usando pulsos cuadrados de 50 μ s de duración, con una intensidad inferior a 0,1 mA y frecuencia de 1 Hz. Los pulsos se aplicaron mediante un estimulador (Cibertec, modelo CS-220A) que recibía la señal desde el adaptador de pulsos, visualizándose en un osciloscopio analógico (Hameg Instruments, HM407-2, Frankfurt, Alemania), que también recibía la señal eléctrica registrada desde el amplificador para la visualización *on-line* de los test de colisión (Figura 9).

De las diferentes poblaciones que componen el NMOC, las únicas células que se registraron fueron las motoneuronas del recto medial, que se identificaron y diferenciaron del resto de poblaciones por tres criterios: i) el test de colisión entre los potenciales de acción ortodrómico y antidrómico después de la estimulación desde el III par craneal al sitio de registro; ii) su localización dorsolateral en el núcleo; iii) su patrón de actividad neuronal característico en relación a los movimientos oculares horizontales, con un incremento en el patrón de disparo asociado a movimientos nasales del ojo.

Una vez finalizada la sesión de registro se procedió al sellado aséptico de la ventana de registro siguiendo el mismo procedimiento explicado en el apartado 3.2.

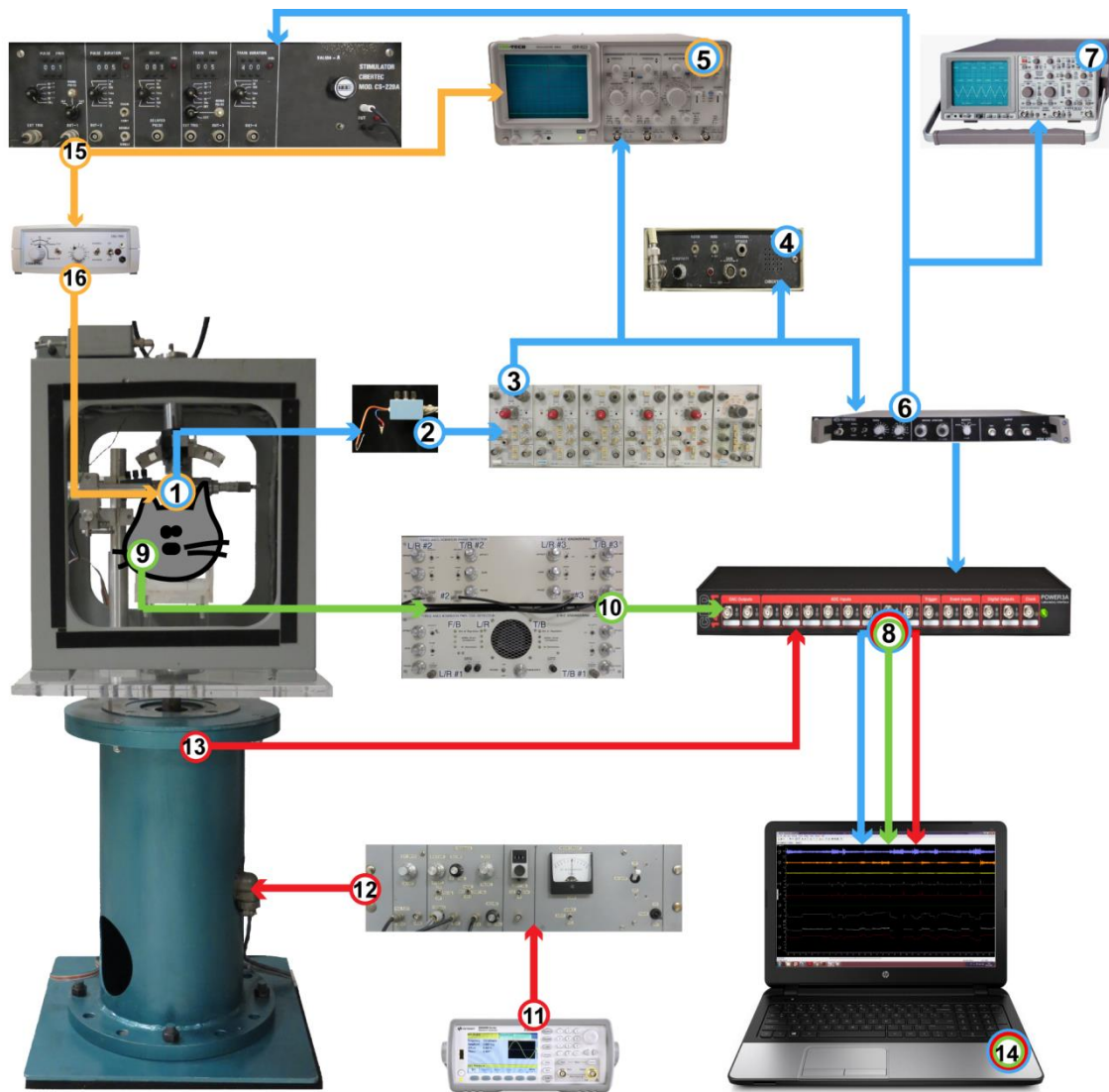


Figura 9. Sistema de registro y almacenaje de la información electrofisiológica. Las señales electrofisiológicas derivadas de la actividad de las motoneuronas del recto medial del NMOC (1, línea azul) se registraron mediante un preamplificador (2) y un amplificador diferencial (3). La señal se envió a un audiomonitor (4), un osciloscopio (5) y, a través de un discriminador de ventana (6), a un segundo osciloscopio (7). Los pulsos producidos por el discriminador de ventana se digitalizaron en la tarjeta de adquisición (8). Por otra parte, las señales derivadas de los movimientos oculares (9, línea verde) se separaron en horizontal y vertical mediante un detector de fases (10) y de ahí, la señal se dirigió al digitalizador (8). Por otro lado, mediante un generador de funciones (11), y un servoamplificador (12) se controló el movimiento de la mesa de registro. Las señales de posición y velocidad de la mesa (13) se digitalizaron (8, línea roja). La información digitalizada se almacenó en un ordenador (14). Finalmente, mediante un generador de pulsos (15), que recibía información de la señal registrada desde el discriminador de ventana (6), conectado a una unidad de aislamiento de estímulo (16) se identificaron los lugares de registro y las motoneuronas del recto medial, mediante el test de colisión (línea naranja).

Por otro lado, se realizaron registros electrofisiológicos de las neuronas del NVL ventral, que proyectan sobre las motoneuronas del recto medial. El NMOE se usó como referencia estereotáctica para localizar el NVL. Para la localización del NMOE, la micropipeta se guio mediante el micromanipulador hacia una posición 6 mm caudal y 1,3 mm lateral al cero estereotático (Berman, 1968), a través del cerebelo, hasta 17-19 mm de profundidad desde la superficie, con un ángulo de elevación de 3-5 grados respecto al eje vertical, lo que proporcionó una inclinación total de la micropipeta de unos 25-27 grados con respecto al plano horizontal. Al igual que en el caso del NMOC, para localizar el NMOE se movió la micropipeta de registro hacia coordenadas calculadas previamente con la ayuda de un mapa estereotático, donde se dibujaron las coordenadas del núcleo así como la posición de la ventana y la aguja de referencia implantada. De nuevo, se determinó la localización final del NMOE tras registrar el potencial de campo antidrómico producido al estimular eléctricamente desde el VI par craneal homolateral. Las neuronas internucleares del NMOE se distinguieron de las motoneuronas mediante test de colisión. A continuación, y siguiendo el método usado por Reisine y col. (1981), la micropipeta se movió 2 mm lateral al NMOE. Las neuronas cuyos axones discurren por el TAD se identificaron por su posición ventral en el núcleo y por su patrón de disparo. Estas células incrementan su frecuencia de descarga para movimientos en dirección contralateral al registro.

3.4. Axotomía

Transcurrido el periodo control, que comprendió 30-45 días, se procedió a la sección unilateral del TAD ($n = 4$) o del FLM ($n = 3$) en el gato. Para la localización del TAD o del FLM, se tomó como referencia estereotáctica la posición del NMOE derecho, debido a la carencia de electrodos de estimulación implantados en ambos tractos.

Para localizar el FLM, una vez localizado el NMOE, la micropipeta se dirigió rostralmente hacia una posición 5,5 mm anterior al NMOE (0,5 caudal al cero estereotático y 0,5-1 mm caudal al núcleo troclear), 0 mm lateral, con una inclinación anteroposterior de 43-45 grados, hasta una profundidad de 19-20 mm. La localización final del FLM se verificó al registrar axones vestibulares que transitan por este tracto y que aumentan su frecuencia de disparo durante movimientos oculares hacia abajo (Iwamoto y col., 1990). También, ocasionalmente, se registró axones de neuronas internucleares del NMOE. Se sustituyó la micropipeta por una microcuchilla de 0,6 mm de ancho para seccionar el FLM derecho a nivel del puente rostral y a través del cerebelo (Pastor y col., 2000). La microcuchilla se fabricó con un tubo de acero inoxidable en cuyo extremo se adhirió un fragmento de cuchilla (Figura 8D). Para realizar la sección del FLM, se

colocó el borde izquierdo de la cuchilla en la aguja de referencia, y se desplazó hacia las coordenadas anteriores, descendiendo hasta los 21-22 mm de profundidad.

El procedimiento para realizar la sección del TAD fue similar. En este caso, la cuchilla tuvo un ancho de 2 mm y se colocó en la misma coordenada anteroposterior y utilizando el mismo ángulo que para la sección del FLM, pero esta vez se introdujo en una posición 0,6 mm lateral hacia la derecha de la línea media, descendiendo a la misma profundidad, lo que produjo la eliminación de la entrada vestibular a las motoneuronas del recto medial del NMOC derecho.

Las sesiones de registro continuaron desde el día de la lesión hasta como máximo 60 días después de la misma. Al igual que durante las sesiones control, los animales se registraron en días alternos, salvo la primera semana posterior a la lesión en la que se hizo diariamente, siguiendo el procedimiento explicado previamente (véase apartado 3.3). En el caso de los animales que no se usaron para registro crónico sino que siguieron procedimientos inmunohistoquímicos a corto plazo, la deaferentación selectiva se realizó siguiendo el mismo procedimiento.

Para la sección del TAD o del FLM en la rata, se colocó al animal anestesiado con una mezcla de clorhidrato de ketamina (20 mg/kg, i.m.; Merial Laboratorios) y xilacina (0,5 mg/kg, i.m.; KVP Pharma) en un marco estereotáxico para su sujeción. Seguidamente, se rasuró y desinfectó la piel de la cabeza y se practicó una incisión longitudinal sobre la línea media desde el borde anterior frontal hasta la sutura lambdaidea, eliminándose las inserciones musculares subyacentes. Con la ayuda de un taladro se realizó una craneotomía en el hueso occipital. A continuación, se seccionó el FLM o el TAD mediante una microcuchilla de 0,2 mm o 0,5 mm de ancho, respectivamente. La lesión se realizó siguiendo coordenadas estereotáxicas: 35 grados de inclinación anteroposterior, 3,5 mm posterior, 0 μ m o 200 μ m lateral a Lambda para la sección del FLM o el TAD, respectivamente, y descendiendo hasta 7,5 mm de profundidad (Paxinos y Watson, 2007).

3.5. Adquisición de datos electrofisiológicos

La posición ocular en los planos horizontal y vertical, así como la velocidad ocular en el plano horizontal de ambos ojos, junto con la actividad neuronal relacionada, la posición y la velocidad de la mesa se adquirieron y almacenaron de manera digital para su posterior análisis usando el programa Spike2 (Cambridge Electronic Design Ltd, Cambridge, Reino Unido). Este programa permitió visualizar dichos canales tanto *on-line* como *off-line* para su posterior

análisis. Los registros se analizaron con programas escritos en Matlab 7.0 (Mathworks, Natick, Massachusetts, EEUU) que permitieron asociar la frecuencia instantánea de disparo de cada célula registrada con la posición y velocidad ocular durante movimientos tanto espontáneos como inducidos por estimulación vestibular.

3.5.1. Análisis de los movimientos oculares espontáneos

El rango de los movimientos oculares (en grados) de ambos ojos en el plano horizontal se determinó a partir de fragmentos de registro de 100 s de movimientos oculares espontáneos durante situación control y tras la sección unilateral del TAD o el FLM. Igualmente, a partir de estos fragmentos se obtuvieron las rectas de regresión entre la posición del ojo homolateral (afectado) y contralateral (control) a la lesión durante las diferentes condiciones experimentales, donde m fue el valor de la pendiente de dicha recta. Además, usando Spike2 y a partir de estos mismos fragmentos de registro, se analizaron la amplitud (en grados) y la velocidad máxima (en grados/s) de los sacádicos durante la situación control y tras la lesión.

3.5.2. Análisis de los movimientos oculares durante el reflejo vestibulo-ocular

El reflejo vestibulo-ocular fue inducido por la rotación sinusoidal de la cabeza a una frecuencia de 0,125 Hz en el plano horizontal y en oscuridad. Se realizaron registros de la velocidad de la cabeza y de ambos ojos en la situación control y tras la deaferentación selectiva. Se seleccionaron fragmentos de 100 s que incluían más de 10 hemiciclos. Estos fragmentos, adquiridos en el programa Spike2, se exportaron hacia un programa escrito en Matlab 7.0, donde se determinó la ganancia del reflejo vestibulo-ocular, calculada como el valor del cociente entre la velocidad del ojo y la velocidad de la cabeza.

Por otro lado, con estos mismos fragmentos y usando Spike2, se determinó la velocidad pico (en grados/s) de las fases rápidas durante el reflejo, mediante cursores de medidas, separando las fases rápidas producidas durante los hemiciclos *on*, de las que ocurrieron durante los hemiciclos *off*. Los hemiciclos *on* fueron aquellos donde las fases lentas del reflejo vestibulo-ocular se dirigían hacia la dirección de activación de la motoneurona (izquierda) y las fases rápidas hacia la dirección de inactivación (derecha), mientras que durante los hemiciclos *off* las fases lentas se dirigían a la derecha y las fases rápidas lo hacían a la izquierda.

3.5.3. Análisis de la actividad neuronal durante movimientos oculares espontáneos

Las motoneuronas del recto medial codifican la posición y la velocidad ocular, con un patrón de disparo tónico-fásico. Así, emiten brotes de potenciales de acción que preceden a los movimientos rápidos o sacádicos en la dirección de activación, dirección *on*, mientras que su frecuencia de disparo disminuye o cesa durante los sacádicos en la dirección *off*. Por otra parte, mantienen una tasa constante de disparo durante las fijaciones oculares, que es directamente proporcional a la posición ocular, con tasas de disparo más altas para fijaciones en posiciones más mediales. Siguiendo este patrón, se establece que la frecuencia de disparo puede ser calculada según la siguiente función (Robinson, 1975):

$$FD = F_0 + k_s \cdot PO + r_s \cdot VO,$$

donde FD es la frecuencia de disparo, F_0 es la tasa de disparo cuando el ojo se encuentra en el centro de la órbita (cero grados), PO es la posición ocular, VO es la velocidad ocular, y k_s y r_s son las sensibilidades a la posición y a la velocidad ocular durante movimientos oculares espontáneos, respectivamente. La tasa de disparo, por tanto, es la suma de un componente tónico sensible a la posición ($k_s \cdot PO$), más un componente fásico sensible a la velocidad ($r_s \cdot VO$), todo ello sumado a la constante F_0 .

Para cada célula registrada, se seleccionaron los datos de fijaciones oculares, abarcando el máximo rango de posiciones, junto con su FD simultánea. Al tomar las fijaciones, se evitaron los 300 ms que siguieron a los sacádicos, para evitar la caída post-sacádica en el disparo (Delgado-García y col., 1986a, b). A partir de los datos seleccionados, se correlacionó la FD en potenciales de acción por segundo (pa/s) con la PO (en grados) mediante regresión lineal. Puesto que durante las fijaciones oculares la velocidad ocular es cero, la ecuación anterior queda como $FD = F_0 + k_s \cdot PO$. La pendiente de la recta de regresión resultante representó la sensibilidad neuronal a la posición ocular (k_s , en pa/s/grado), y el punto donde dicha recta corta el eje de ordenadas, la F_0 (en pa/s).

Por otra parte, el análisis neuronal durante los movimientos sacádicos se realizó mediante regresión lineal simple, enfrentando la frecuencia de disparo, tras sustraerle el componente de posición ($k_s \cdot PO$), a la velocidad ocular durante movimientos sacádicos, expresando la frecuencia de disparo mediante la ecuación:

$$FD - k_s \cdot PO = F_0 + r_s \cdot VO$$

donde la pendiente de la recta de regresión resultante representa la sensibilidad a la velocidad ocular durante movimientos oculares sacádicos en el plano horizontal, r_s (en pa/s/grados/s).

Al igual que con las fijaciones, se intentó que el muestreo de sacádicos cubriera el mayor rango posible en términos de velocidad, amplitud y dirección de los movimientos oculares.

Para ambas sensibilidades neuronales, k_s y r_s , se realizó un análisis más detallado calculando por separado los componente *on* y *off* (Delgado-García y col., 1986a, b). Así, se seleccionaron movimientos oculares durante fijaciones (k_s) o durante movimientos sacádicos (r_s) dirigidos hacia la dirección de activación (*on*, izquierda), o bien hacia la dirección de inactivación (*off*, derecha), obteniéndose así los parámetros k_s *on*, k_s *off*, r_s *on* y r_s *off*. En el caso de la k_s *off* y r_s *off*, se excluyeron del análisis aquellas fijaciones o sacádicos donde la FD fuese cero.

3.5.4. Análisis de la actividad neuronal durante el reflejo vestibulo-ocular

Se analizó la respuesta de la población de motoneuronas del recto medial durante estimulación vestibular sinusoidal. Para estudiar las sensibilidades a la posición y a la velocidad ocular durante el reflejo vestibulo-ocular se seleccionaron las fases lentas del nistagmo vestibular, excluyendo las fases rápidas, que corresponden con la actividad en brote de la motoneurona, y se analizaron por regresión lineal múltiple, según la ecuación:

$$FD = F_0 + k_v \cdot PO + r_v \cdot VO,$$

donde los dos coeficientes de la regresión representan la sensibilidades a la posición (k_v , en pa/s/grado) y a la velocidad (r_v , en pa/s/grado/s) durante la estimulación vestibular.

Al igual que en el análisis de las fijaciones y sacádicos durante movimientos oculares espontáneos, durante la estimulación vestibular se realizó un análisis por separado de los componente *on* (fases lentas en la dirección de activación, izquierda) y *off* (fases lentas hacia la dirección de inactivación, derecha) de ambas sensibilidades, obteniéndose así los parámetros k_v *on*, k_v *off*, r_v *on* y r_v *off*.

Tras la deaferentación, el ojo homolateral a la lesión se vio sensiblemente limitado en sus movimientos en el plano horizontal. Por ello, los cálculos de las sensibilidades a la posición y la velocidad durante movimientos oculares espontáneos o durante el reflejo vestibulo-ocular se basaron en los movimientos producidos por el ojo contralateral, por la disimetría causada tras la lesión.

En resumen, para cada motoneurona se obtuvieron una serie de parámetros relacionados con su señal de disparo oculomotora. A su vez, los datos se agruparon en

diferentes poblaciones, dependiendo del tipo de lesión (control, sección unilateral del TAD y sección unilateral del FLM) y del tiempo post lesión (corto plazo entre 0 y 5 días tras la lesión, entre 6 y 15 días, entre 16 y 25 días, y largo plazo más allá de 25 días).

3.5.5. Análisis cualitativo de la actividad neuronal durante movimientos oculares de vergencia

Se estudió cualitativamente la aparición de movimientos espontáneos de vergencia y su influencia en el disparo de las motoneuronas del recto medial, en la situación control y tras la sección unilateral del TAD o el FLM.

3.6. Técnicas de marcaje anterógrado para microscopia óptica

Con el objetivo de rastrear el curso y arborización de los terminales axónicos aferentes a la subdivisión del recto medial, se inyectó biocitina como trazador anterógrado (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EEUU) en un total de cuatro animales control. Previamente, todos los animales fueron preparados quirúrgicamente para el registro crónico (véase apartado 3.2). Un total de dos animales se inyectaron con biocitina en el NVL homolateral, para marcar los axones y terminales vestibulares que hacen sinapsis sobre la subdivisión del recto medial. Otros dos animales recibieron la inyección en el NMOE contralateral, marcando los aferencias a las motoneuronas del recto medial procedentes de las neuronas internucleares contralaterales.

Para la inyección del marcador anterógrado en el NMOE, los animales profundamente anestesiados con una mezcla de clorhidrato de ketamina (20 mg/kg, i.m.; Merial Laboratorios) y xilacina (0,5 mg/kg, i.m.; KVP Pharma) se situaron en la mesa de registro y se localizó el NMOE mediante registro del potencial de campo antidrómico utilizando una micropipeta de registro con NaCl 2 M (véase 3.3). Entonces, la micropipeta fue sustituida por otra con 20-25 μm de diámetro en la punta, rellena de una solución de biocitina al 3% en tampón Tris 0,05 M, pH 7,6. La biocitina se inyectó en el NMOE contralateral por iontoforesis, aplicando pulsos de corriente positiva de 7 μA de intensidad y 800 ms de duración a una frecuencia de 1 Hz, durante 20 minutos, en tres lugares separados por 400 μm en dirección anteroposterior. Por otra parte, en los animales inyectados en el núcleo vestibular, una vez localizado el NMOE, se desplazó la micropipeta 2 mm lateralmente (Berman, 1968) para localizar el NVL, donde se registraron e identificaron neuronas vestibulares con señal horizontal. Se sustituyó entonces la micropipeta por otra con biocitina y se siguió el mismo procedimiento que el anteriormente descrito.

Transcurridas 24 horas los animales se volvieron a anestesiarse y se perfundieron intracardialmente como se explica a continuación (sección 3.8).

3.7. Inyección de rodamina en los rectos mediales

La rodamina es un marcador retrógrado que se utilizó para identificar la población de motoneuronas del recto medial. Un total de 11 gatos se inyectaron con rodamina al 20% (Sigma Aldrich) en el músculo recto medial de forma bilateral. Se inyectaron animales con sección unilateral en el TAD ($n = 6$) o en el FLM ($n = 5$). Cuatro animales se usaron para estudios morfológicos tres días tras la deaferentación unilateral del TAD ($n = 2$) o del FLM ($n = 2$), mientras que un total de siete animales, procedentes del registro crónico, siguieron estudios inmunohistoquímicos a largo plazo con lesión en las aferencias vestibulares ($n = 4$) o en las neuronas internucleares del NMOE ($n = 3$).

Además, se inyectó rodamina bilateralmente en el músculo recto medial de 23 ratas deaferentadas selectivamente ($n = 12$ y $n = 11$ con sección del TAD o el FLM, respectivamente), distribuidas en diferentes tiempos de supervivencia: 24, 48 o 96 horas tras la axotomía.

Los animales experimentales se anestesiaron con clorhidrato de ketamina (20 mg/kg, i.m.; Merial Laboratorios) mezclado con xilacina (0,5 mg/kg, i.m.; KVP Pharma) previa inyección de sulfato de atropina (0,5 mg/kg, i.m.; Braun) para reducir los reflejos vagales. Mediante un separador de párpados se expuso el ojo y con ayuda de unas tijeras y unas pinzas, bajo un microscopio de cirugía (Olympus, Olympus OME, Japón), se accedió y aisló el músculo recto medial. Con una microjeringa Hamilton se inyectó un volumen de 8 μ l de rodamina al 20% en el músculo recto medial de gatos y 1 μ l de rodamina en la rata. Se dejaron tiempos de supervivencia de 5-7 días en el gato y de 2-3 días en la rata. Pasado este periodo los animales se perfundieron como se explica a continuación.

3.8. Perfusión intracardiaca y obtención de cortes cerebrales

Los gatos se anestesiaron, con clorhidrato de ketamina (20 mg/kg, i.m.; Merial Laboratorios) mezclado con xilacina (0,5 mg/kg, i.m.; KVP Pharma). Una vez insensibilizado, se le administró una dosis letal de pentobarbital sódico (100 mg/kg, intraperitoneal [i.p.]; Vetoquinol Especialidades, Madrid, España). Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (35 mg/kg, i.p.). En ese momento, se realizó, con la ayuda de un bisturí, una incisión longitudinal desde la

parte superior del esternón hasta el abdomen. Posteriormente con ayuda de unas tijeras se separaron las costillas y se accedió al diafragma y la caja torácica. Se localizó el corazón y se le liberó del pericardio que lo envuelve. Se inyectó heparina intracardialmente (8,5 mg/kg; Mayne Pharma, Salisbury South, Australia) como anticoagulante en el ventrículo izquierdo. Se realizó una incisión en el ventrículo izquierdo por la que se introdujo una cánula de 4 mm de diámetro en el gato o de 1 mm en la rata, que se dirigió hacia el inicio del cayado de la aorta. Para permitir el drenaje se realizó un corte en la aurícula derecha. Se perfundió con una bomba peristáltica (Masterflex L/S, Cole Parmer, Barrington, Illinois, EEUU), pasando en primer lugar una solución salina isotónica (NaCl 0,9%, 0,5 o 0,2 litros en gato y rata, respectivamente), seguido por el fijador, preparado con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4 (1,5 o 0,4 litros en gato y rata, respectivamente). Una vez finalizado el proceso se extrajo el cerebro, que se postfijó en la misma solución fijadora durante 2 horas.

En los animales que se inyectaron con biocitina la perfusión siguió el mismo protocolo pero la solución fijadora fue de paraformaldehído al 3% y glutaraldehído al 1,25% en PB 0,1 M, pH 7,4.

Finalmente, se realizaron cortes coronales del tronco del encéfalo de gatos, de 50 μ m de grosor, con un vibratomo (Leica VT1000S, Wetzlar, Alemania), que se recogieron en tampón fosfato salino (PBS) y azida sódica al 0,05%. Por otro lado, utilizando un criostato (Leica CM1850, Wetzlar, Alemania), se realizaron rodajas cerebrales coronales del tronco del encéfalo de la rata, de 50 μ m de espesor, previa crioprotección del tejido con sacarosa al 30% en PBS. Los cortes se recogieron en PBS-glicerol (1:1).

3.9. Técnicas morfológicas

Con las secciones coronales obtenidas, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas contra diversas proteínas, donde los marcajes fueron dobles y ocasionalmente simples. Las tinciones se dirigieron contra:

- Sinaptofisina, marcador de botones sinápticos. Es una proteína presente en las membranas de las vesículas sinápticas (Thomas y col., 1988). Se utilizó para comparar los niveles de deaferentación en el NMOC en los diferentes tipos de lesiones.
- Calretinina, proteína tamponadora de calcio, presente en las neuronas internucleares del NMOE y en neuronas del NVL (Baizer y Baker, 2006; de la Cruz y col., 1998). Se usó para identificar específicamente las aferencias a las motoneuronas del recto medial.
- Proteína asociada al crecimiento-43 (GAP-43), proteína abundante en los conos de crecimiento axonales durante el desarrollo (Oestreicher y col., 1997). Se ha demostrado el incremento de su expresión en neuronas que han sufrido daño neuronal (Benowitz y col., 1990; Grasselli y Strata, 2013). Se utilizó para demostrar la existencia de axones en crecimiento alrededor de la población de motoneuronas del recto medial deaferentadas.
- Factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y neurotrofina 3 (NT-3), miembros de la familia de las neurotrofinas. Son péptidos que actúan como factores de crecimiento durante el desarrollo y que regulan muchos aspectos de las funciones neuronales en adulto. Se midió la presencia de estas proteínas en las neuronas motoras del recto medial, a corto y largo plazo tras la deaferentación selectiva. Además, se estudió el patrón de distribución de estos factores en el sistema oculomotor y en los sistemas motores facial y lingual.

En la tabla 1 se detallan las técnicas para las que se utilizó cada anticuerpo, sus concentraciones de uso, así como los anticuerpos secundarios y sus concentraciones en cada caso.

Marcador	Animal	Anticuerpo primario	Técnica	Uso	Anticuerpo secundario	Uso
Calretinina	gato	Conejo anti-calretinina (Swant)	Microscopía óptica	1:1000	Biotinilado burro anti-conejo (Vector)	1:250
			Microscopía confocal		Cy5 burro anti-conejo (Jackson)	1:50
	rata	Cabra anti-calretinina (Merck)	Microscopía óptica	1:2500	Biotinilado burro anti-cabra (Vector)	1:250
			Microscopía confocal	1:500	Cy5 burro anti-cabra (Jackson)	1:200
Sinaptofisina	gato	Ratón anti-sinaptofisina (Merck)	Microscopía confocal	1:2000	FITC burro anti-ratón (Jackson)	1:50
GAP-43	gato	Ratón anti-GAP-43 (Merck)	Microscopía confocal	1:1000	FITC burro anti-ratón (Jackson)	1:50
BDNF	gato	Conejo anti-BDNF (Santa Cruz)	Microscopía confocal	1:100	Biotinilado burro anti-conejo (Vector)	1:250
	rata		Microscopía confocal	1:400	Biotinilado burro anti-conejo (Vector)	1:500
			Western blot	1:100	HRP cabra anti-conejo (Vector)	1:3000
NT-3	gato	Conejo anti-NT-3 (Santa Cruz)	Microscopía confocal	1:100	Biotinilado burro anti-conejo (Vector)	1:250
	rata		Microscopía confocal	1:400	Biotinilado burro anti-conejo (Vector)	1:500
			Western blot	1:500	HRP cabra anti-conejo (Vector)	1:3000
NGF	gato	Conejo anti-NGF (Santa Cruz)	Microscopía confocal	1:100	Biotinilado burro anti-conejo (Vector)	1:250
	rata		Microscopía confocal	1:250	Biotinilado burro anti-conejo (Vector)	1:500
			Western blot	1:500	HRP cabra anti-conejo (Vector)	1:3000
ChAT	rata	Cabra anti-ChAT (Merck)	Microscopía confocal	1:500	TRITC burro anti- cabra (Jackson)	1:50
GAPDH	rata	Ratón anti-GAPDH (Merck)	Western blot	1:3000	HRP cabra anti-ratón (Vector)	1:3000

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en las técnicas inmunohistoquímicas para microscopía óptica o confocal y Western blot. En las inmunohistoquímicas para neurotrofinas, la señal del anticuerpo secundario biotinilado fue amplificada por Streptavidina-Cy2 (1:800 en gato y 1:400 en rata, Jackson).

3.9.1. Técnicas morfológicas para microscopia óptica de campo claro

Cortes cerebrales a nivel del NMOE, NVL y del sitio de la lesión, procedentes de todos los animales experimentales, siguieron un protocolo inmunohistoquímico dirigido contra calretinina. Las rodajas se lavaron tres veces con PBS durante 10 minutos, tras los cuales se sumergieron en una solución de bloqueo con suero de burro al 10% (NDS, Sigma Aldrich) preparado con PBS con tritón al 0,1% (PBS-T) durante 45 minutos. Posteriormente el tejido, se incubó durante 12 horas con una solución de PBS-T con NDS al 5% y azida sódica al 0,05% que contenía el anticuerpo primario, conejo anti-calretinina en gato (1:1000; Swant, 7697, Marly, Suiza) o cabra anti-calretinina en rata (1:2500; Merck, AB1550, Temecula, California, EEUU). A continuación, se lavaron los cortes con PBS-T tres veces durante 10 minutos, tras lo cual se sumergieron durante 2 horas en una dilución del anticuerpo secundario biotinilado (burro anti-IgG de conejo o anti-IgG de cabra, respectivamente, 1:250; Vector Labs., Burlingame, California, EEUU). Seguidamente las secciones se incubaron durante 90 minutos en el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC) al 1% preparado en PBS-T 30 minutos antes de su uso. A continuación, se lavaron 2 veces con PBS y 2 veces con tampón Tris-Cl 0,1 M pH 8 (TB). Tras ello, el tejido se preincubó en 3, 3'-tetrahidroclorhidrato de diaminobencidina (DAB) al 0,05% en TB durante 1 minuto, al que se añadió el peróxido de hidrógeno al 0,01% en agua. La reacción se detuvo añadiendo TB. Finalmente los cortes se lavaron con PBS, tres veces durante 10 minutos, montándose después en portaobjetos gelatinizados. Una vez secos, se deshidrataron en una batería de alcoholes de concentración creciente y se aclararon con xilol. Finalmente, se cubrieron con el medio de montaje DPX (Panreac, Barcelona, España). Todo el protocolo inmunohistoquímico se hizo a temperatura ambiente y en agitación suave. Cortes cerebrales a nivel del TAD o el FLM se usaron para el análisis de la extensión de ambas proyecciones. La cuantificación se realizó mediante el conteo del número de procesos axónicos inmunorreactivos para calretinina en el lado control.

Secciones cerebrales procedentes de los animales que habían sido inyectados con biocitina se incubaron durante 90 minutos con solución ABC al 1% preparado en PBS-T 30 minutos antes de su uso. Posteriormente las secciones se lavaron con PBS y TB, y se preincubaron con DAB al 0,05% en TB, siguiendo el protocolo de revelado y montaje explicado anteriormente. Una vez que los cortes se secaron, se realizó una contratinción con la técnica de Nissl. Para ello, los cortes se sumergieron durante 1 minuto en el colorante, que consistió en una solución de azul de toluidina (Panreac) al 0,1% en tampón acetato pH 3,5. A continuación, se deshidrataron en una batería de alcoholes de concentración creciente, se aclararon con xilol y se cubrieron con medio de montaje DPX (Panreac).

3.9.2. Técnicas inmunohistoquímicas para microscopía óptica confocal

Se seleccionaron cortes cerebrales de gato a nivel del NMOC para realizar tinciones inmunohistoquímicas dobles contra sinaptofisina y calretinina. Las secciones se lavaron en PBS durante 5 minutos y seguido se incubaron en una solución de borohidruro sódico al 1% durante 10 minutos, con el fin de desenmascarar antígenos. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS-T, y tras ello los cortes se sumergieron en NDS (Sigma Aldrich) al 10% en PBS-T durante 45 minutos. Posteriormente, los cortes se incubaron 12 horas en el anticuerpo primario, dirigido contra sinaptofisina (ratón anti-sinaptofisina, 1:2000; Merck, MAB329, Darmstadt, Alemania) preparado en PBS-T con 5% NDS y 0,05% de azida sódica. Tras tres lavados de 10 minutos en PBS-T, las secciones se incubaron durante 2 horas en una solución de PBS-T con el anticuerpo secundario burro anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, 1:50; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pensilvania, EEUU). Finalizado el protocolo de tinción inmunocitoquímica de la sinaptofisina, los cortes se lavaron tres veces con PBS-T, 10 minutos por lavado. Posteriormente se bloquearon nuevamente con NDS (Sigma Aldrich) al 10% en PBS-T durante 45 minutos. Tras ello, los cortes se incubaron durante 12 horas con el anticuerpo primario contra calretinina (conejo anti-calretinina, 1:1000; Swant), preparado en PBS-T con 5% de NDS y 0,05% de azida sódica. Al finalizar la incubación con el anticuerpo primario se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBS-T. A continuación, las secciones se incubaron durante 2 horas en una solución de PBS-T con el anticuerpo secundario burro anti-IgG de conejo conjugado con indodicarbocianina (Cy5, 1:50; Jackson ImmunoResearch). Tras tres lavados finales en PBS, las secciones se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con medio de montaje Dako (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca).

Se usaron secciones cerebrales de rata a nivel del NMOC para realizar tinciones inmunohistoquímicas contra calretinina. Los cortes se lavaron con PBS y se sumergieron en una solución de PBS-T con NDS al 10% durante 45 minutos. Tras el bloqueo, las rodajas cerebrales se incubaron durante 12 horas con el anticuerpo primario dirigido contra calretinina (cabra anti-calretinina, 1:500; Merck) preparado en PBS-T con 5% NDS y 0,05% de azida sódica. A continuación, las secciones se lavaron tres veces con PBS-T, durante 10 minutos por lavado y se bañaron durante 2 horas en una solución de PBS-T con el anticuerpo secundario (burro anti-IgG de cabra marcado con Cy5, 1:200; Jackson ImmunoResearch). Finalmente, se lavaron tres veces durante 10 minutos, se montaron en portas gelatinizados y se cubrieron con medio de montaje Dako (DakoCytomation).

Para la inmunohistoquímica frente a GAP-43, los cortes cerebrales se lavaron tres veces en PBS durante 10 minutos. Tras ello, se sumergieron en solución de bloqueo con NDS (Sigma Aldrich) al 10% en PBS-T durante 45 minutos. Después, los cortes se incubaron durante 12 horas en una solución de PBS-T con NDS al 5% y 0,05% de azida sódica y con el anticuerpo primario dirigido contra la proteína GAP-43 (ratón anti-GAP-43, 1:1000; Merck, MAB347, Billerica, Massachusetts, EEUU). Tras tres lavados de 10 minutos en PBS, se incubaron durante 2 horas en una solución de PBS-T con el anticuerpo secundario burro anti-IgG de ratón conjugado con FITC (1:50; Jackson ImmunoResearch). Finalmente se lavaron tres veces durante 10 minutos en PBS y las secciones encefálicas se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con medio de montaje (DakoCytomation).

Por último, se llevaron a cabo tinciones inmunohistoquímicas contra las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NGF en rodajas cerebrales de gato a nivel de la subdivisión del recto medial y en cortes del tronco del encéfalo de rata control a nivel de los núcleos oculomotores (NMOC, NMOT y NMOE), del núcleo facial y del núcleo hipogloso.

Las secciones encefálicas se lavaron en PBS durante 5 minutos y seguidamente se incubaron en una solución de borohidruro sódico al 1% durante 10 minutos. A continuación se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS-T, y tras ello las rodajas se sumergieron en NDS (Sigma Aldrich) al 10%, preparado en PBS-T, durante 45 minutos. Posteriormente, los cortes se incubaron 12 horas en el anticuerpo primario conejo anti-BDNF, sc-546, conejo anti-NT-3, sc-547, o conejo anti-NGF, sc-548, (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EEUU) preparados en PBS-T con 5% NDS y 0,05% de azida sódica. La concentración del anticuerpo primario varió dependiendo de la especie. En el gato los anticuerpos primarios frente a neurotrofinas se usaron a concentración 1:100. En la rata, los anticuerpos se utilizaron a una concentración de 1:400 para BDNF y NT-3. En la inmunohistoquímica frente a NGF en cortes de rata el protocolo usado hasta este punto varió ligeramente. Tras el lavado inicial con PBS los cortes se incubaron en tampón citrato 0,01 M pH 6, en un baño a 74°C durante 40 minutos. Posteriormente se dejaron enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS-T durante 5 minutos. A continuación, las secciones encefálicas se incubaron en la solución bloqueo de NDS al 5% en PBS-T a 37°C durante 30 minutos. Tras ello, los cortes se sumergieron en una solución con el anticuerpo primario (conejo anti-NGF, sc-548, Santa Cruz Biotechnology), con una dilución 1:250 en PBS-T con 5% NDS y 0,05% de azida sódica durante 72 horas a 4°C.

Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron con PBS-T, y se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado a una concentración de 1:250 y 1:500 en gato y rata, respectivamente (burro anti-IgG de conejo, Vector Labs.), en PBS-T durante 2 horas. Se retiró el anticuerpo secundario, y tras tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno, los cortes se sumergieron durante 45 minutos en una solución de Streptavidina-Cy2 en PBS (1:800 en gato y 1:400 en rata, Jackson ImmunoResearch). Finalmente, las secciones encefálicas de gato se lavaron nuevamente con PBS, se montaron sobre portas gelatinizados y se cubrieron con medio de montaje Dako (DakoCytomation) para su visualización.

Por otro lado, las motoneuronas del tronco del encéfalo de la rata se identificaron mediante marcaje con un anticuerpo primario contra acetilcolina transferasa (ChAT, cabra anti-ChAT; Merck, AB144P, Temecula, California, EEUU), dilución 1:500 en PBS-T con 5% NDS y 10% azida sódica. Brevemente, una vez finalizado el protocolo de tinción inmunocitoquímica contra las neurotrofinas, los cortes se sometieron a tres nuevos lavados con PBS-T y se bloquearon con NDS al 10% en PBS-T durante 45 minutos. A continuación, las secciones se incubaron en la solución con el anticuerpo primario frente a ChAT, durante 12 horas, y tras ello se lavaron 3 veces con PBS-T, 10 minutos por lavado, y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo, tetrametil rodamina 5,6-isotiocianato (TRITC, burro anti-IgG de cabra, Jackson ImmunoResearch), diluido a 1:50 en PBS-T, durante 2 horas. Tras este periodo se llevaron a cabo tres nuevos lavados con PBS de 10 minutos cada uno. Finalmente, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con medio de montaje.

Para todas las tinciones, salvo las realizadas en ratas control, la población de motoneuronas del recto medial se identificó mediante la presencia de rodamina previamente inyectada bilateralmente en el músculo recto medial como marcador retrógrado (véase 3.7). Además, todos los protocolos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y en agitación suave.

3.10. Análisis de los datos morfológicos

3.10.1. Visualización y captura de imágenes

Se tomaron fotografías con un microscopio óptico Axiophot (Zeiss, Jena, Alemania) conectado a una cámara fotográfica (AXIOCAM ERc 5s) en formato TIFF (24 bits). Se fotografiaron los cortes marcados mediante tinciones inmunohistoquímicas contra calretinina, revelados con DAB, procedentes de los sitios de lesión, los sitios de inyección de la biocitina y del NMOC con marcaje anterógrado. También se tomaron las imágenes de cortes de lesión teñidos mediante Nissl. Se capturaron imágenes a diferentes magnificaciones (1,25x, 2x, 5x, 10x, 20x y 40x).

Los cortes teñidos con anticuerpos fluorescentes se fotografiaron mediante un microscopio confocal LSM 7 DUO (Zeiss), tomando imágenes de las motoneuronas de la subdivisión del recto medial control y lesionada, de animales en las diferentes situaciones experimentales. Además se fotografiaron secciones de la rata control a nivel de los núcleos del sistema oculomotor, el núcleo facial y el hipogloso.

Este microscopio estaba equipado con tres láseres que permitían capturar la fluorescencia emitida por los fluorocromos asociados a los anticuerpos secundarios, FITC (láser de argón, longitud de onda de activación: 488 nm); rodamina o TRITC (longitud de onda de activación: 561 nm) y Cy5 (longitud de onda de activación: 631 nm). Las imágenes (1024x1024 píxeles) se capturaron por excitación con dos o tres láseres diferentes, según el tejido. La escala de grises se ajustó a su máximo rango dinámico. Se tomaron fotomicrografías a distintos aumentos (40x y 63x) en 2-6 planos focales diferentes, con una separación de 1 μm (63x) o 1,5 μm (40x). El programa utilizado fue ZEN 2012 SP2 (Zeiss).

3.10.2. Análisis de imágenes

Las fotomicrografías se analizaron mediante el programa ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, EEUU). En imágenes adquiridas con el objetivo de 40x, se midió la densidad óptica (valor promedio de gris) en el neuropilo de secciones del NMOC inmunomarcados contra sinaptofisina (Figura 10A). Para ello, en dicho programa, se usaron campos de 30,5 x 30,5 μm , sustrayendo el valor correspondiente al color del fondo, evitando zonas del neuropilo ocupado por somas de motoneuronas (Figura 10B). Para cada corte procesado, los datos del lado lesionado se expresaron como % del lado control. Este mismo procedimiento se usó para el análisis de calretinina y de GAP-43 en el neuropilo.

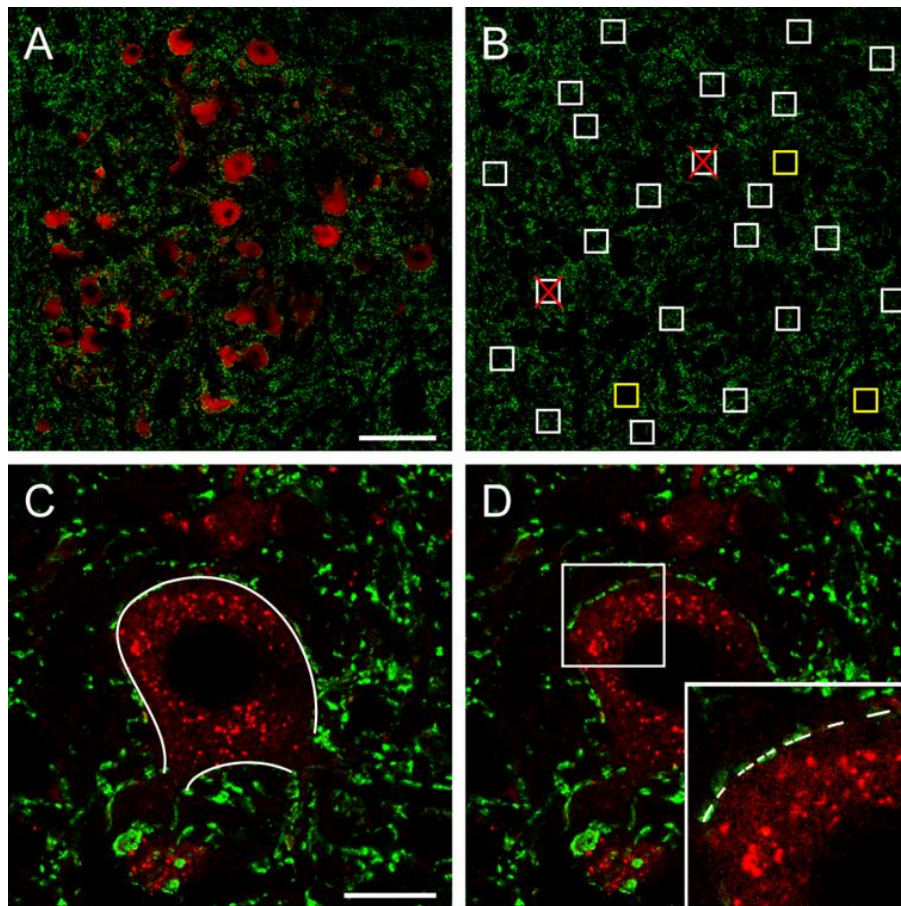


Figura 10. Cálculo de la cobertura sináptica en el soma y el neuropilo de las motoneuronas del recto medial. **A:** Imagen de microscopía confocal, tomada con el objetivo de 40x, de una sección cerebral de 50 μm de espesor, donde se presenta la subdivisión del recto medial del NMOC. Las motoneuronas aparecen identificadas por rodamina como marcador retrógrado (rojo). En verde, señal inmunopositiva contra sinaptofisina, marcador específico de botones sinápticos. **B:** Medidas de cobertura sináptica en el neuropilo mediante la disposición al azar de cuadrados de 30,5 μm de lado (cuadrados blancos). Se evitó tomar mediciones en zonas ocupadas por motoneuronas (cuadrados blanco con aspa roja). Las medidas fueron corregidas tomando muestras de densidad óptica del fondo (cuadrados amarillos). **C, D:** Imágenes de microscopía confocal a 63x que muestran una motoneurona del recto medial identificada con rodamina. En **C** se muestra el perímetro de la célula, delimitado con líneas blancas. Nótese que se evitó tomar en la medida del perímetro cualquier proceso dendrítico. En **D**, se representa la región del perímetro somático ocupada por botones sinápticos positivos para sinaptofisina, resaltados con líneas blancas. El análisis de la cobertura sináptica de calretinina se hizo de la misma forma. Barras de calibración: **A**, 100 μm (**A-B**); **C**, 20 μm (**C-D**).

Además, se analizó en imágenes tomadas a 63x, la densidad de terminales sinápticos aferentes a los somas de las motoneuronas del recto medial, comparándose el lado control con el lado lesionado en todos los animales experimentales (Pastor y col., 1997; Morado-Díaz y col., 2014). Por tanto, se midió el porcentaje de perímetro somático cubierto por botones sinaptofisina-positivos y calretinina-positivos (Figura 10C y D), el número de botones

inmunorreactivos para sinaptofisina o calretinina, la longitud media de los botones así como el perímetro celular.

Las imágenes tomadas en el microscopio confocal de secciones cerebrales de gato y rata con marcaje frente a BDNF, NT-3 o NGF también se analizaron con el programa ImageJ. El soma de las motoneuronas, exceptuando el núcleo, se perfiló en la imagen con rodamina o ChAT en el gato y la rata, respectivamente, y en el área seleccionada se realizaron medidas de la densidad óptica de la imagen para las diferentes neurotrofinas. En el gato, los valores del lado lesionado se relativizaron a los obtenidos en el lado control. En las imágenes procedentes de cortes cerebrales de rata, se tomaron además cuatro muestras del fondo de un tamaño comparable al de una motoneurona, y se calculó la media. El valor de la densidad óptica de cada una de las células analizadas se dividió por la media de las densidades ópticas del fondo en su imagen correspondiente. Este valor se denominó “razón entre la intensidad de marcaje en el soma respecto al fondo” (IF). Las células se consideraron positivas para la expresión de una determinada neurotrofina cuando presentaron una densidad óptica al menos 5 veces superior al valor del fondo, es decir, la IF fue igual o superior a 5.

3.11. Western blot

Para la realización de los Western blots se sacrificaron ratas adultas ($n = 6$) por decapitación bajo anestesia profunda (pentobarbital sódico, 35 mg/kg, i.p.) a las que se les extrajeron de forma inmediata los músculos extraoculares, el músculo buccinador y los músculos de la lengua. El tejido se homogeneizó incubándolo durante 20 minutos en tampón de lisis enfriado en hielo, que contenía un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Morcuende y col., 2013). A continuación, el tejido se disgregó por sonicación (cuatro pulsos de 6 segundos) y se centrifugó a 4°C y 13.000 rpm durante 30 minutos. Las proteínas, presentes en el sobrenadante, se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando albúmina sérica bovina (BSA) para realizar la recta de calibrado. Las proteínas se diluyeron en tampón de carga (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, glicerol 10%, dodecilsulfato sódico [SDS] 2%, β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,05%) y se desnaturalizaron en un baño a 95°C durante 6 minutos. A continuación, se separaron por electroforesis usando 50 μ g de proteínas por carril. La electroforesis se llevó a cabo en geles discontinuos, constituidos por un gel de empaquetamiento al 4% y otro de separación al 15% de acrilamida. El gel de separación se preparó en una dilución de acrilamida/bis-acrilamida al 30% en tampón Tris-HCl pH 8,8, SDS 10%, persulfato amónico (APS) 10% y tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,1%. El gel de

empaquetamiento contenía los mismos componentes, excepto que el tampón utilizado fue Tris-HCl pH 6,8. Los geles cargados con las muestras se sumergieron en la cubeta que contenía tampón de electroforesis, a voltaje constante (100 mV) durante una hora. Concluida la electroforesis se realizó la transferencia a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) en tampón de transferencia al 20% de metanol. La transferencia se hizo a voltaje constante (80 mV) durante 20 minutos en la cámara fría. Una vez transferidas las proteínas a la membrana se realizó el bloqueo de las uniones inespecíficas mediante BSA al 10% en TBS-Tween 0,1% (Tween 0,1% en tampón Tris-Cl salino) durante una hora, seguido de una incubación durante 12 horas a 4°C en una solución con el anticuerpo primario: conejo anti-BDNF, 1:100, sc-546, conejo anti-NT-3, 1:500, sc-547, o conejo anti-NGF, 1:500, sc-548, (Santa Cruz Biotechnology) preparado en TBS-Tween 0,1% y BSA al 5%. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces, 10 minutos por lavado, con TBS-Tween 0,1% y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, cabra anti-IgG de conejo, 1:3000, Vector Labs) preparado en TBS-Tween 0,1% durante 90 minutos a temperatura ambiente. Por último, las membranas se sometieron de nuevo a tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween y a un lavado de 10 minutos con TBS. La inmunorreacción se detectó con el Kit WesternBright Quantum de Western blot (Advansta, K-12042, Menlo Park, California, EEUU) y las bandas se visualizaron mediante un equipo de imagen quimioluminiscente (LAS-3000, Fujifilm, Düsseldorf, Alemania).

Tras el revelado quimioluminiscente, las membranas se lavaron con tampón de separación (Thermo Fisher Scientific, 21059, Rockford, Illinois, EEUU) durante 10 minutos y tras ello se sumergieron en una solución de BSA al 5% en TBS-Tween 0,1% durante 1 hora. A continuación, se incubaron durante 12 horas en una solución con un anticuerpo contra gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ratón anti-GAPDH, 1:3000; Merck, MAB374, Temecula, California, EEUU) que se utilizó como proteína control. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos con TBS-Tween 0,1% y se incubaron con una solución TBS-Tween 0,1% que contenía el anticuerpo secundario conjugado con HRP (cabra anti-IgG de ratón, 1:3000; Vector Labs) durante 90 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween 0,1% y una vez con TBS durante 10 minutos por lavado. Finalmente, se detectó la señal quimioluminiscente del mismo modo que para los anticuerpos de neurotrofinas. En la tabla 1 se especifican los anticuerpos primarios y secundarios utilizados, así como su concentración de uso.

Las imágenes obtenidas con el equipo de quimioluminiscencia se sometieron a análisis de densitometría con el programa Multi-Gauge V.3.0 (Fujifilm), cuantificando la banda correspondiente a la forma madura (13 kDa), así como la banda de la isoforma pro-neurotrofina

(37, 35 y 27 kDa para BDNF, NT-3 y NGF, respectivamente) para cada factor neurotrófico. La GAPDH se cuantificó analizando la banda que se obtuvo en torno a 38 kDa de peso molecular.

Para cada membrana, los datos se expresaron en relación a los valores de GAPDH tras substraerle la medida del fondo. Además, los datos obtenidos se normalizaron como porcentajes con respecto a los músculos extraoculares. Finalmente, se calcularon valores medios para la forma madura y la pro-neurotrofina en cada músculo.

3.12. Estadística

Las comparaciones entre los grupos de datos se llevaron a cabo mediante el test de análisis de la varianza (ANOVA) para uno o dos factores, seguido de una comparación múltiple *post hoc* usando el método Holm-Sidak. En aquellos casos en se tuvo que comparar dos grupos se utilizó la prueba *t*-test. En todos los casos, el nivel de significación fue de 0,05 usando el programa Sigma Plot 11 (Systat Software GMBH, San Jose, California, EEUU). Los valores de los distintos datos numéricos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Aferencias a las motoneuronas del recto medial

4.1.1. Correlatos anatómicos

Las dos principales entradas de información pontinas a la subdivisión del recto medial del NMOC proceden de las neuronas internucleares del NMOE, que proyectan a través del FLM, y de las neuronas del NVL, cuyos axones discurren por el TAD (Baker y Highstein, 1978; Büttner-Ennever y Akert, 1981; Highstein y Baker, 1978; Highstein y Reisine, 1981; Reisine y col., 1981). En este trabajo se ha querido corroborar que ambos tipos neuronales conducen sus terminales axónicos hasta las motoneuronas del recto medial, demostrando el curso de la proyección del TAD además de la ya conocida proyección del FLM. Para ello, se utilizó biocitina como marcador anterógrado, inyectado electroforéticamente en el NMOE contralateral (Figura 11A, asterisco) y en el NVL homolateral al núcleo de interés (Figura 11B, asterisco). Se pudieron observar axones marcados dentro de los límites del FLM, en el caso de la inyección en el NMOE (Figura 11C), o bien en el TAD, en el caso de que la inyección fuese a nivel del NVL (Figura 11D). A simple vista, se observó que la cantidad de axones que discurren por el TAD, procedentes de las neuronas vestibulares, es mucho menor que la de axones procedentes del NMOE. Además, se pudo delimitar la zona por la que discurren ambos tractos, próximos entre sí pero diferenciados topográficamente (Figura 11C y D, líneas discontinuas). En la figura 11E y F, se observan axones y terminales axónicos procedentes del NMOE y del NVL, respectivamente, identificados por el marcaje con biocitina, empaquetados densamente alrededor de la subdivisión del recto medial del NMOC (delimitada por flechas); las restantes subdivisiones del NMOC aparecieron libres de terminaciones. Fotomicrografías tomadas a mayores aumentos mostraron que las aferencias procedentes de las neuronas del NMOE y del NVL formaron ramificaciones con varicosidades con forma de botón alrededor de los somas y en el neuropilo de la población de motoneuronas del recto medial (Figura 11G y J, respectivamente). Sin embargo, se vieron ciertas diferencias en el marcaje anterógrado procedente de ambos núcleos: los terminales procedentes de las neuronas internucleares del NMOE ocuparon principalmente el neuropilo, formando también contactos con los cuerpos celulares de las motoneuronas (Figura 11H e I), mientras que las aferencias vestibulares se encontraron más frecuentemente en relación con somas de las motoneuronas del recto medial (Figura 11K y L).

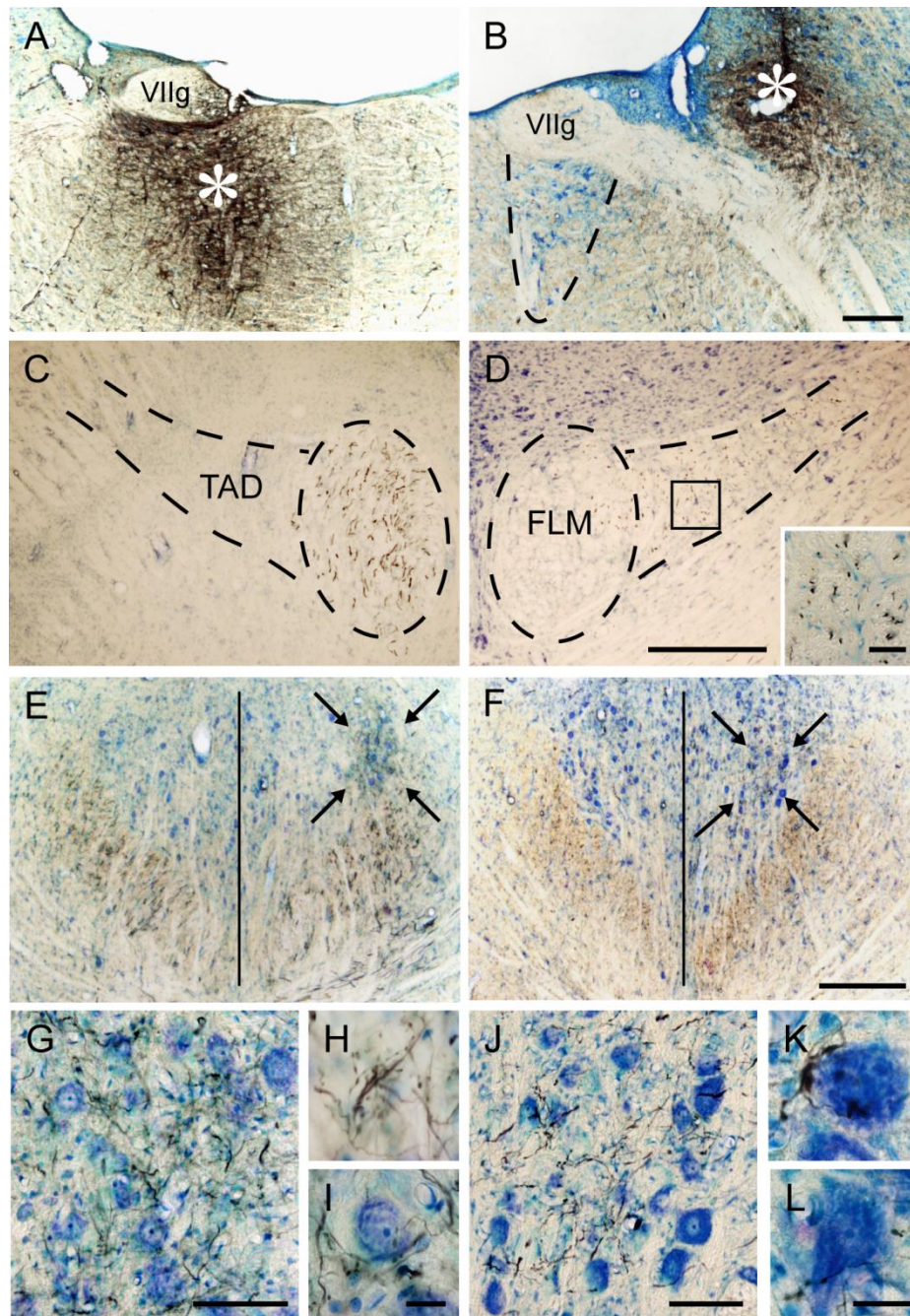


Figura 11. Trazado anterógrado de las aferencias pontinas a la población de motoneuronas del recto medial. **A, B:** Fotomicrografías que muestran los sitios de inyección de biocitina (asteriscos) en el NMOE (**A**) y el NVL (**B**). La línea discontinua en **B** señala los límites ventrales y laterales del NMOE. **C, D:** Axones marcados con biocitina en su curso a través del FLM contralateral (**C**, para la inyección mostrada en **A**) o para el TAD homolateral (**D**, para la inyección mostrada en **B**). La imagen en **C** se muestra invertida a su posición natural. El inserto muestra la imagen aumentada de los axones enmarcados en **D**. **E, F:** Marcaje anterógrado de los terminales de neuronas internucleares del NMOE (**E**) y de neuronas vestibulares del NVL (**F**) sobre las motoneuronas del recto medial. Las flechas indican los límites de la subdivisión. La línea vertical indica la línea media. **G-L:** Fotomicrografías de alto aumento de las motoneuronas del recto medial ilustrando la presencia de terminales marcados con biocitina en el neuropilo y rodeando el soma neuronal tras la inyección en el NMOE (**G-I**) o en el NVL (**J-L**). VIIg: genu del nervio facial. TAD: tracto ascendente de Deiters. FLM: fascículo longitudinal medial. Barras de calibración: 500 μ m (en **B** para **A** y **B**; en **D** para **C** y **D**; en **F** para **E** y **F**); 100 μ m (en **G** y **J**); 20 μ m (en **I** para **H** e **I**; en **L** para **K** y **L**). Barra de calibración del inserto: 100 μ m.

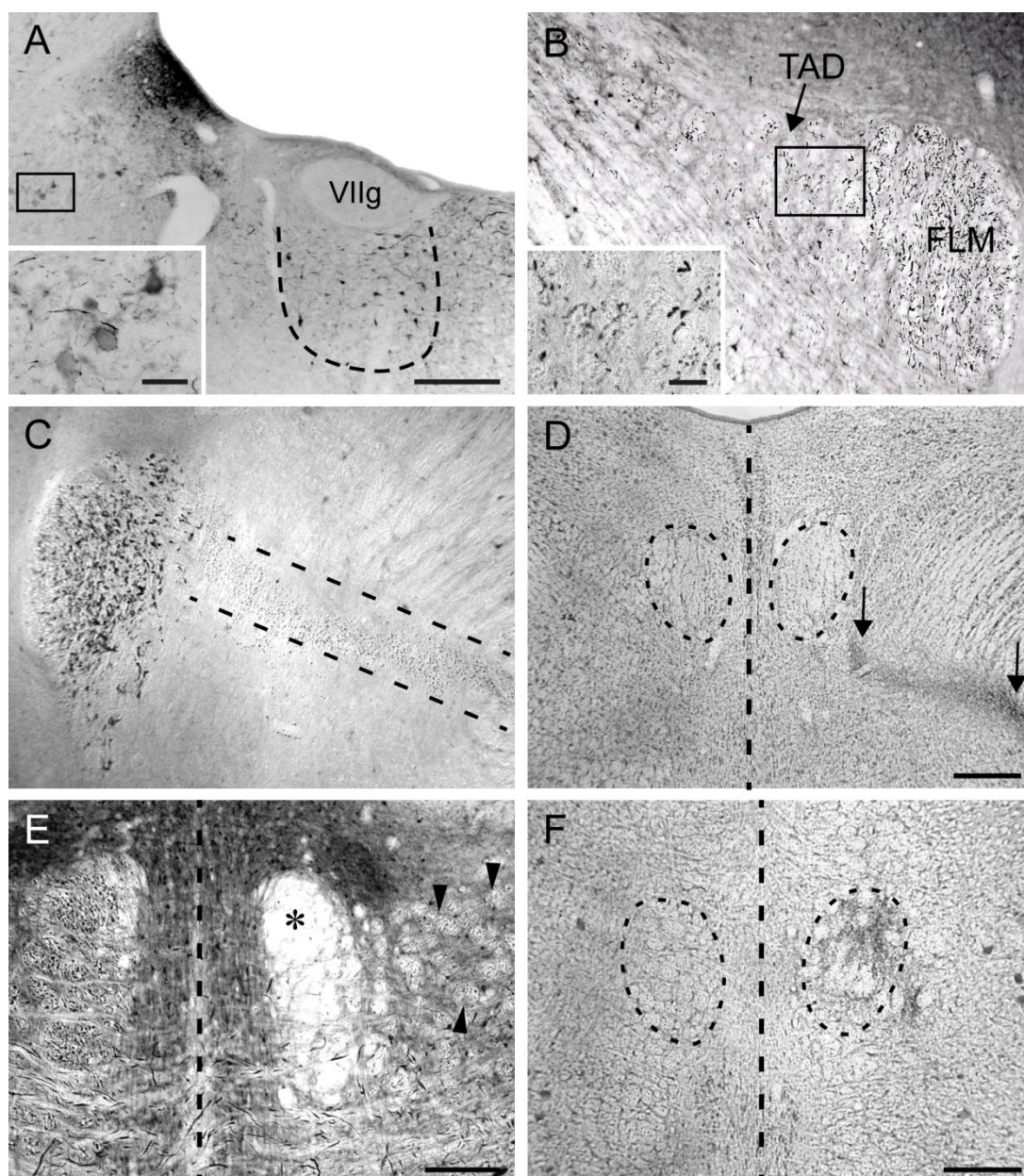


Figura 12. Marcaje inmunocitoquímico contra calretinina en las aferencias pontinas de las motoneuronas del recto medial tras la lesión unilateral en el gato. **A:** Fotomicrografía a nivel del NVL (recuadro) y NMOE (línea discontinua) de un gato con lesión en el tracto ascendente derecho (TAD) derecho, tras una tinción inmunocitoquímica contra calretinina. **B:** Fotomicrografía de una sección mesencefálica control a nivel del TAD y el fascículo longitudinal medial (FLM) mostrando axones calretinina positivos en ambos tractos. El inserto muestra la ampliación del área señalada por el cuadrado. **C:** Sección mesencefálica de una animal con lesión en el TAD. Nótese la ausencia de axones positivos para calretinina en dicho tracto y la presencia de tejido cicatricial delimitado por la línea discontinua. **D:** Demostración de la cicatriz en el tejido producida por la sección del TAD (delimitada por las flechas). FLM señalados por círculos discontinuos bilateralmente. **E:** Fotomicrografía mostrando el marcaje para calretinina tras la lesión unilateral del FLM. El asterisco señala el FLM lesionado. Nótese la ausencia de procesos inmunopositivos para calretinina. Las puntas de flecha señalan haces del TAD. **F:** Demostración mediante tinción de Nissl de la sección unilateral del FLM. FLM señalado por círculos discontinuos bilateralmente. Las líneas discontinuas verticales señalan la línea media en **D**, **E** y **F**. VIIg: genu del nervio facial. Barra de calibración: 500 µm (en **A**, **D** y **F**); 250 µm (en **E** para **B**, **C** y **E**). Barra de calibración de los insertos: 50 µm.

Un marcador de las neuronas internucleares del NMOE y de las neuronas del NVL en el gato es la calretinina, proteína de unión a calcio de 29 kDa (de la Cruz y col., 1998; Baizer y Baker, 2006). A pesar de ello, aún no se ha demostrado la presencia de axones inmunopositivos para calretinina en el TAD. Mediante un estudio de la inmunorreactividad frente a la calretinina en secciones coronales a nivel de la protuberancia, se confirmó que ambos tipos celulares, las neuronas internucleares del NMOE (Figura 12A, delimitado por línea discontinua) y las neuronas vestibulares ventrolaterales, cuyos axones originan el TAD (Figura 12A, inserto), presentaron un marcaje positivo frente a calretinina. Estos resultados estuvieron en concordancia con los obtenidos en secciones cerebrales controles más rostrales, donde se hallaron axones inmunorreactivos a calretinina tanto a nivel del FLM como del TAD (Figura 12B). Sin embargo, tras la sección del TAD (Figura 12C) o del FLM (Figura 12E), sólo se vieron axones marcados a nivel del tracto no lesionado. En la figura 12D y F se puede observar la cicatriz en el tejido tras la sección unilateral del TAD (delimitado por flechas) o del FLM (delimitado por línea discontinua) mediante tinción de Nissl, respectivamente. Asimismo, se cuantificó el número de axones inmunomarcados para calretinina que discurrían por el TAD o el FLM. Este análisis reveló que el FLM presenta un mayor número de axones que el TAD ($p < 0,001$, t -test), con una extensión del FLM ($818,3 \pm 26,8$ axones positivos por sección, $n = 4$) casi cuatro veces mayor que la proyección vestibular ($243,3 \pm 34,7$, $n = 4$).

Por lo tanto, se ha confirmado que tanto las neuronas internucleares del NMOE como las neuronas del NVL proyectan sobre la subdivisión del recto medial del NMOC, que dichas aferencias son inmunopositivas para calretinina y que la extensión del FLM es mayor que la del TAD, referida al número de axones que discurren por los mismos.

4.1.2. Disparo neuronal de las aferencias a la subdivisión recto medial

Se estudiaron aspectos cualitativos del patrón de disparo de las neuronas aferentes a las motoneuronas del recto medial. Durante movimientos espontáneos, la actividad de las neuronas de la región ventral del NVL correlacionó con la posición ocular, incrementando la frecuencia de descarga para fijaciones desviadas hacia el lado contralateral (izquierdo), y disminuyéndola hacia posiciones homolaterales al lado de registro (derecho; Figura 13A). Por otra parte, las neuronas internucleares del NMOE presentaron un disparo tónico-fásico. Así, estas células presentan una tasa de disparo tónica, constante, que aumenta de forma proporcional a posiciones oculares cada vez más hacia la dirección de activación, homolateral. Además, emiten brotes de potenciales de acción de alta frecuencia durante movimientos sacádicos homolaterales,

mientras que reducen su disparo durante movimientos en la dirección de inactivación o contralateral (Figura 13B). Las neuronales vestibulares también mostraron pequeños brotes en el disparo hacia la dirección de activación (*on*) y pausas para la dirección opuesta, de inactivación (*off*), pero mucho menores que los registrados para las neuronas del NMOE (Figura 13A).

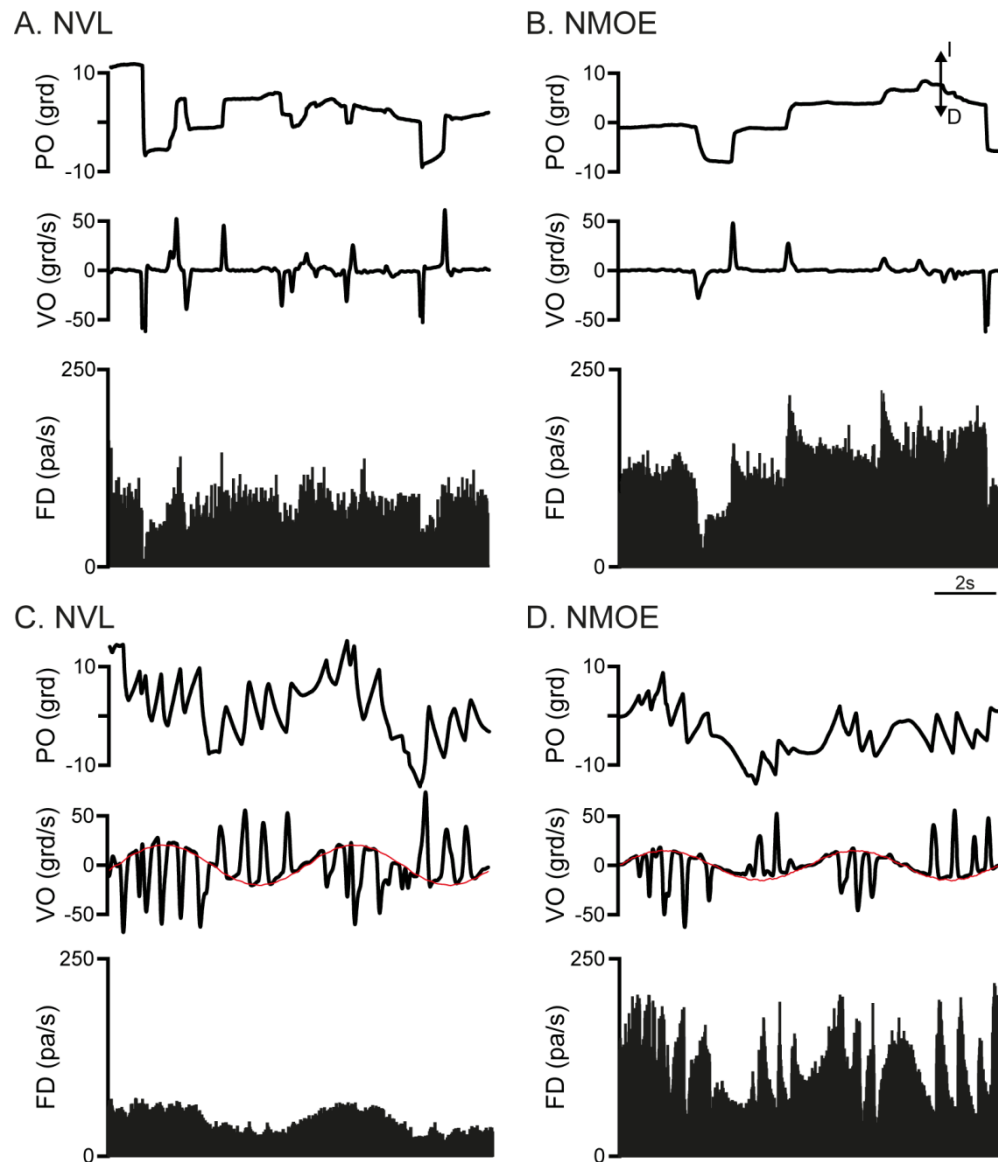


Figura 13. Propiedades de descarga de las aferencias a las motoneuronas del recto medial. **A, B:** En cada panel se ilustra desde arriba hacia abajo: registro de la posición (PO, en grados) y de la velocidad ocular (VO, en grados/s) en el plano horizontal del ojo homolateral al registro, así como la frecuencia de disparo (FD, en potenciales de acción/s) de una neurona del NVL (**A**) y de una neurona internuclear del NMOE (**B**), durante movimientos oculares espontáneos. **C, D:** Lo mismo que en **A** y **B**, respectivamente, pero durante estimulación vestibular. En el registro de la velocidad ocular se ilustra la velocidad invertida de la cabeza (línea roja, en grados/s). I y D indican la dirección de movimiento del ojo hacia la izquierda o hacia la derecha, respectivamente.

También se estudió el comportamiento de las aferencias a las motoneuronas del recto medial durante el reflejo vestibulo-ocular. Las neuronas internucleares del NMOE modularon su actividad en respuesta a la estimulación vestibular, de forma proporcional a la posición y velocidad de los ojos durante las fases lentas del reflejo, con brotes de actividad neuronal durante las fases rápidas en dirección homolateral, y pausas durante las fases rápidas en dirección contralateral (Figura 13D). Por otro lado las neuronas de Deiters también modularon su respuesta durante el reflejo vestibulo-ocular, pero de forma más atenuada que las neuronas internucleares del NMOE (Figura 13C), codificando en su disparo principalmente velocidad de la cabeza.

En la tabla 2 se muestran las sensibilidades neuronales a la posición y la velocidad, durante movimientos espontáneos o estimulación vestibular, así como el umbral del reclutamiento neuronal obtenidos de las neuronas del NVL registradas. Además, en esta misma tabla también se recogen estos parámetros para las neuronas internucleares del NMOE obtenidos de un estudio anterior (Benítez-Temiño y col., 2002). Para las neuronas vestibulares el valor más elevado se obtuvo para la sensibilidad neuronal a la velocidad durante el reflejo vestibulo-ocular. Todos los parámetros analizados resultaron reducidos ($p < 0,001$, t -test) en comparación con los valores obtenidos previamente para las neuronas internucleares del NMOE.

	Neuronas del NVL	Neuronas internucleares del NMOE
k_s (pa/s/grd)	$1,9 \pm 0,4^*$ $n = 12$	$6,9 \pm 3,3$ $n = 87$
r_s (pa/s/grd/s)	$0,16 \pm 0,03^*$ $n = 12$	$1,6 \pm 0,6$ $n = 36$
k_v (pa/s/grd)	$1,4 \pm 0,4^*$ $n = 12$	$10,5 \pm 4,6$ $n = 30$
r_v (pa/s/grd/s)	$1,4 \pm 0,3^*$ $n = 12$	$2,2 \pm 1,2$ $n = 30$
U (grd)	$-42,8 \pm 11,2^*$ $n = 12$	$-11,7 \pm 6,3$ $n = 87$

Tabla 2. Propiedades fisiológicas de las neuronas del NVL y de las neuronas internucleares del NMOE. Se muestran la media \pm EEM y la n de la sensibilidad neuronal a la posición y la velocidad ocular durante movimientos oculares espontáneos (k_s y r_s , respectivamente) y durante estimulación vestibular (k_v y r_v , respectivamente), así como el umbral de reclutamiento neuronal (U). Los datos de las neuronas internucleares del NMOE han sido tomados de Benítez-Temiño y col., 2002. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las neuronas del NVL y las neuronas internucleares del NMOE ($p < 0,001$, t -test).

4.2. Movimientos oculares tras la axotomía

4.2.1. Movimientos oculares espontáneos

La sección del TAD o del FLM produjo diferentes alteraciones en los movimientos oculares, tanto en magnitud como en duración. En la situación control los ojos se movieron de forma conjugada, realizando desplazamientos que abarcaron los dos hemisferios de visión alrededor de la posición primaria, 0 grados (Figura 14A). Tras la sección del TAD derecho, las alteraciones motoras observadas durante movimientos oculares espontáneos variaron dependiendo del momento tras la lesión. Así, durante los primeros 5 días tras la lesión (corto plazo), los movimientos de aducción del ojo homolateral a la lesión (Figura 14B, línea continua verde claro) disminuyeron en amplitud, viéndose parcialmente limitados al hemisferio derecho pero, sin afectación del ojo control (Figura 14B, línea discontinua). Sin embargo, a partir de la primera semana tras la lesión y hasta 2 meses, que fue el periodo de tiempo más largo medido (largo plazo), se observó una recuperación progresiva de los movimientos del ojo afectado (Figura 14C, línea continua verde oscuro).

Inmediatamente después de la sección unilateral del FLM derecho, el ojo homolateral a la lesión (Figura 14D, línea continua azul claro) mostró una reducción severa de la amplitud de los movimientos en el plano horizontal, con una incapacidad para cruzar la posición primaria hacia posiciones mediales, en la dirección de aducción. Además, la sección del FLM a corto plazo produjo un marcado incremento en la aparición de movimientos oculares horizontales no conjugados, en comparación con la situación control. Todos estos efectos se observaron entre 0 y 5 días tras la lesión (corto plazo). Posteriormente y hasta el máximo periodo de tiempo estudiado (2 meses, largo plazo), los movimientos espontáneos del ojo afectado (Figura 14E, línea continua azul oscuro) presentaron cierto grado de recuperación motora, sin alcanzarla completamente, con notable dificultad para realizar desplazamientos en el hemisferio izquierdo. Además, el alto grado de conjugación en los movimientos espontáneos horizontales mostrado durante el periodo control nunca se recuperó. El efecto en los movimientos oculares espontáneos tras la axotomía del FLM a largo plazo fue muy similar al producido tras la sección del TAD a corto plazo.

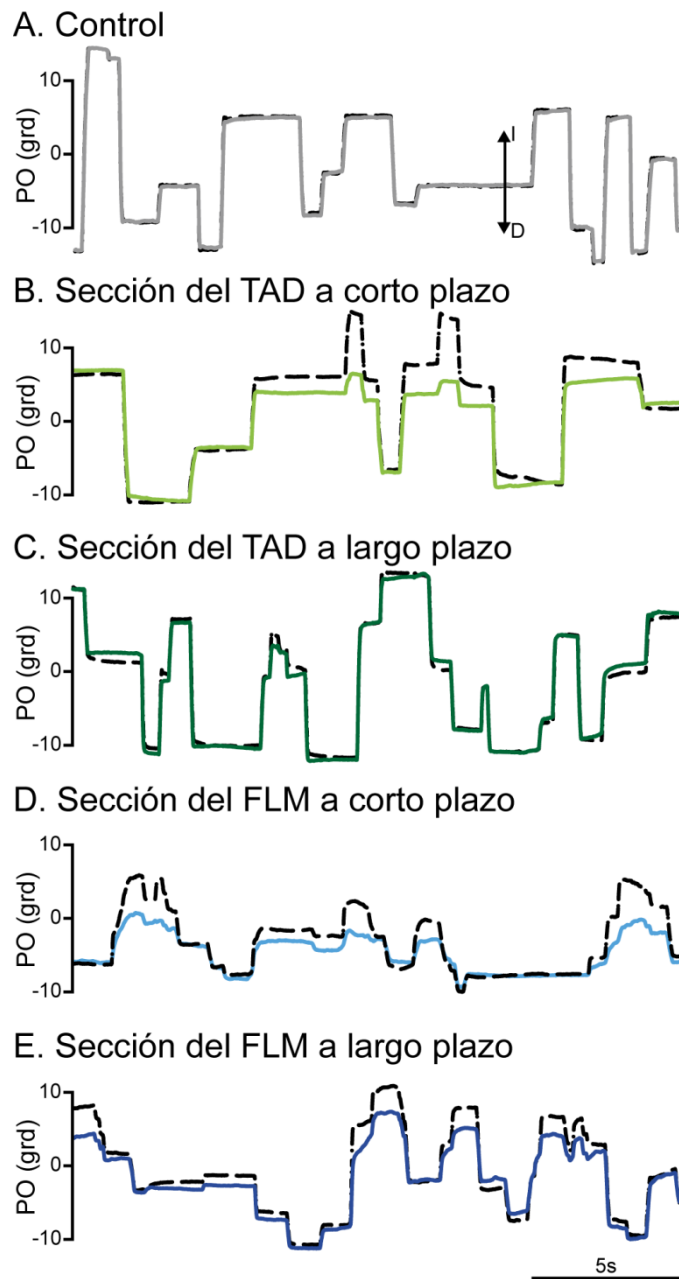


Figura 14. Cambios en los movimientos oculares espontáneos horizontales en respuesta a la sección unilateral del TAD o del FLM. Registros de la posición ocular horizontal (PO, en grados) en control (A), 2 y 26 días tras la sección unilateral del TAD (B y C, respectivamente) o del FLM (D y E, respectivamente) durante movimientos oculares espontáneos. Las líneas continuas y discontinuas representan la velocidad del ojo homolateral y contralateral al sitio de la lesión, respectivamente. I y D indican la dirección de movimiento del ojo, hacia la izquierda o hacia la derecha, respectivamente. Los movimientos oculares del ojo afectado a largo plazo tras la lesión en el TAD son muy similares a los controles, a diferencia de la lesión en el FLM.

4.2.2. Movimientos oculares espontáneos: Análisis

Los movimientos oculares espontáneos en el plano horizontal se analizaron midiendo la conjugación de los desplazamientos oculares, así como el rango oculomotor y la amplitud y velocidad máxima de las sacádicos.

Se estudió el curso temporal de los datos obtenidos, para lo que se dividieron en rangos de tiempo: hasta 5 días, de 6 a 15 días, de 16 a 25 días y entre 25 y 60 días tras la lesión. Los primeros 5 días tras la lesión se consideraron como efectos a *corto plazo* y se representó en todas las figuras con colores claros, mientras que los datos tomados más de 25 días tras la lesión se consideraron como de *largo plazo* y se representaron con colores oscuros. Los rangos intermedios, entre corto y largo plazo se mostraron con líneas discontinuas y color gris. Los datos provenientes de animales con el TAD seccionado se representaron con colores verdes, mientras que los obtenidos de animales con lesión en el FLM se ilustraron con colores azules.

La conjugación de los movimientos oculares espontáneos se analizó realizando las rectas de regresión lineal entre la posición del ojo afectado (derecho) y el ojo no afectado (izquierdo; Figura 15A y B). En la situación control, la relación entre la posición horizontal del ojo derecho y del ojo izquierdo es una recta cuya pendiente, m , tiene un valor aproximado de 1 (Figura 15A y B, recta negra). La sección del TAD produjo una reducción a corto plazo en la pendiente de la recta, debido a la disminución en la amplitud de los movimientos del ojo afectado, y en su desplazamiento hacia posiciones menos mediales que el ojo control (Figura 15A, recta verde claro). Estos valores se recuperaron a largo plazo e igualaron a los del ojo control (Figura 15A, recta verde oscuro). Por su parte, la sección del FLM produjo una reducción severa e irreversible en la amplitud de movimientos del ojo afectado, siendo más intensa durante la primera semana tras la axotomía, lo que se manifestó como un decremento de la pendiente de la recta (Figura 15B, recta azul claro). Así, el ojo derecho permaneció preferentemente en posiciones laterales, invadiendo esporádicamente el hemicampo izquierdo. A largo plazo hubo una ligera recuperación, que sin embargo no llegó a alcanzar los valores control (Figura 15B, recta azul oscuro). En las figuras 15A y B, se excluyen de las gráficas las nubes de dispersión de puntos para mejorar su visualización.

Se analizó la evolución temporal del rango de los movimientos oculares espontáneos (Figura 15C). El rango motor medio durante la situación control fue de $33,5 \pm 0,4$ grados ($n = 135$ periodos de 100 s de movimientos oculares espontáneos). Tras la sección unilateral del TAD ($n = 41$) o del FLM ($n = 27$) el rango medio descendió hasta $28,0 \pm 1,0$ y $19,9 \pm 0,9$ grados, respectivamente ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones

múltiples), observándose una recuperación motora progresiva tras la lesión del TAD hasta alcanzar un rango de $31,6 \pm 1,1$ grados a largo plazo ($n = 26$, $p = 0,082$). Tras la sección del FLM, se observó cierto grado de recuperación motora que no fue completa ($p < 0,001$), con un rango motor a largo plazo de $26,0 \pm 0,6$ grados ($n = 29$, Figura 15C). El efecto en el rango oculomotor tras la sección del TAD fue menor que el producido en el mismo periodo de tiempo tras la lesión del FLM ($p < 0,001$).

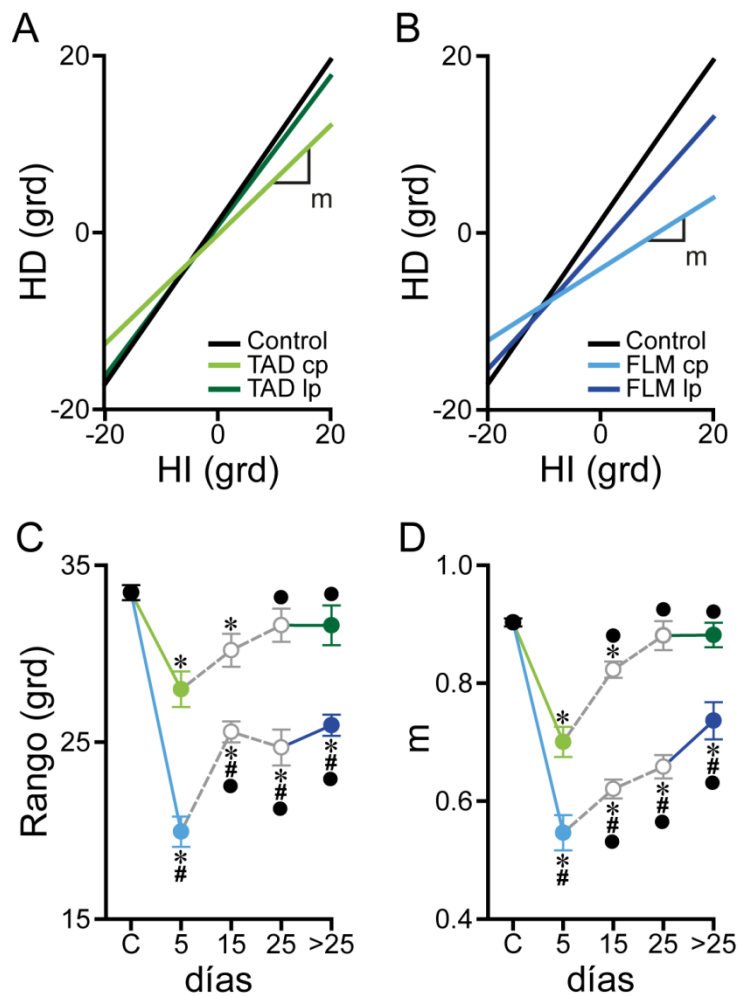


Figura 15. Análisis estadístico de los movimientos oculares espontáneos horizontales tras la sección del TAD o del FLM. **A, B:** Regresión lineal entre los movimientos espontáneos horizontales del ojo derecho (HD, homolateral a la lesión) y el ojo izquierdo (HI, contralateral a la lesión) en animales control (recta negra), y con el TAD (**A**, rectas verdes) o el FLM (**B**, rectas azules) lesionado, a corto (cp, colores claros) o largo plazo (lp, colores oscuros). La pendiente de la recta de regresión resultante es m , valor usado para medir la conjugación entre ambos ojos. Nótese la reducción de la pendiente de la recta de regresión a corto plazo tras los dos tipos de lesión, y la posterior recuperación a largo plazo en el ejemplo de lesión del TAD a largo plazo, siendo similar al control. **C, D:** Curso temporal del rango motor del ojo homolateral a la lesión (**C**, en grados) y del valor m (**D**), tras la sección del TAD (línea verde) o del FLM (línea azul). Se representan los valores medios \pm EEM; $21 \leq n \leq 135$ (intervalos de registro de 100 s) y se ilustran las diferencias significativas respecto al control (*), entre corto y largo plazo dentro de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#; $p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak). Para ambos parámetros, solo los registros realizados más de 15 días tras la lesión del TAD mostraron valores similares al control.

En la figura 15D, se muestra la cuantificación del valor m . A corto plazo, en ambas lesiones, se observó una disminución del valor medio de m ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples), que pasó de $0,9 \pm 0,01$ en control ($n = 135$ periodos de 100 s de movimientos oculares espontáneos) a $0,70 \pm 0,03$ y $0,55 \pm 0,03$ para la sección del TAD ($n = 41$) y del FLM ($n = 27$), respectivamente. Tras ambas lesiones, se vio una recuperación con el tiempo del valor m , siendo completa en animales con el TAD seccionado ($0,88 \pm 0,11$, $n = 21$, $p = 0,326$, periodo de 16-25 días) pero no en animales con el FLM lesionado (largo plazo, $0,74 \pm 0,03$, $n = 29$, $p < 0,001$). Igual que ocurrió con los valores del rango motor, el valor m disminuyó más acusadamente en animales con el FLM seccionado que en animales carentes de la proyección vestibular en todos los puntos temporales ($p < 0,001$), donde los efectos en animales TAD a corto plazo se asemejaron a los que se mantenían en animales FLM a largo plazo.

A continuación, se estudió la amplitud y la velocidad máxima de los sacádicos durante movimientos oculares espontáneos, analizándose por separado estos parámetros para sacádicos *on* (Figura 16A y C, respectivamente) y *off* (Figura 16B y D, respectivamente). En la situación control la amplitud y la velocidad máxima de los sacádicos *on* fue de $6,9 \pm 0,2$ grados y $101,4 \pm 2,2$ grados/s, respectivamente ($n = 439$ sacádicos). Ambos parámetros se redujeron significativamente ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) a corto plazo tras la sección del TAD ($5,1 \pm 0,2$ grados y $82,2 \pm 3,4$ grados/s, respectivamente, $n = 201$) o del FLM ($2,8 \pm 0,2$ grados y $48,1 \pm 1,9$ grados/s, respectivamente, $n = 194$). Los animales con el TAD lesionado mostraron una recuperación tanto de la amplitud como de la velocidad máxima de los sacádicos *on* a partir de 6 días tras la deaferentación ($5,1 \pm 0,2$ grados y $82,2 \pm 3,4$ grados/s, $p = 0,253$ y $p = 0,452$, respectivamente, $n = 201$, para el intervalo 6-15 días), y manteniéndose hasta 2 meses tras la misma ($6,5 \pm 0,2$ grados y $98,9 \pm 3,0$ grados/s, $p = 0,147$ y $p = 0,458$, respectivamente, $n = 197$, largo plazo). Sin embargo, esto no se observó en los animales carentes de la entrada procedente del NMOE, donde ambos parámetros se mantuvieron reducidos y diferentes del control ($p < 0,001$) hasta al menos 2 meses tras la lesión ($3,4 \pm 0,2$ grados y $54,4 \pm 2,0$ grados/s, $n = 250$). Resultados similares se obtuvieron cuando se analizaron los sacádicos *off*. Así, tanto la amplitud como la velocidad máxima tras la lesión del TAD ($5,6 \pm 0,3$ grados y $68,2 \pm 2,6$ grados/s, respectivamente, $n = 201$) o del FLM ($3,4 \pm 0,2$ grados y $50,2 \pm 1,6$ grados/s, respectivamente, $n = 200$) a corto plazo se vieron reducidos significativamente ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) en comparación con los datos medidos durante situación control ($7,7 \pm 0,2$ grados y $99,1 \pm 2,5$ grados/s, respectivamente, $n = 388$). Nuevamente, los animales con el FLM

seccionado mostraron significativamente reducidos ($p < 0,001$) ambos parámetros hasta el máximo periodo de tiempo analizado ($4,5 \pm 0,2$ grados y $57,8 \pm 2,1$ grados/s para amplitud y velocidad máxima, respectivamente, $n = 188$, largo plazo). En cambio, los animales carentes de la entrada vestibular, mostraron una recuperación tanto de la amplitud como de la velocidad máxima de los sacádicos *off* que se mantuvo a largo plazo sin ser diferente de la situación control ($7,3 \pm 0,3$ grados y $93,1 \pm 3,4$ grados/s, $p = 0,230$ y $p = 0,134$, respectivamente, $n = 161$, largo plazo). Asimismo, tanto la amplitud como la velocidad máxima obtenida en los animales con el TAD seccionado fueron estadísticamente mayores que las medidas en animales con lesión en el FLM, tanto para los sacádicos *on* como para los *off*.

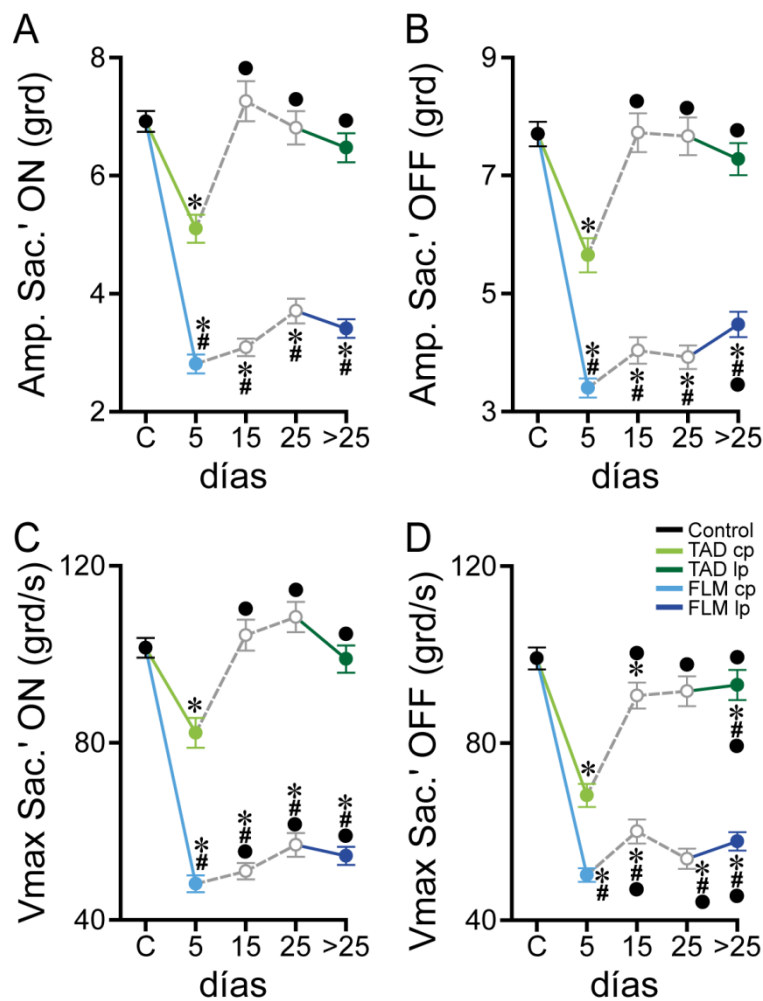


Figura 16. Estadística comparativa de la amplitud y velocidad máxima de los sacádicos durante movimientos oculares espontáneos tras la lesión. A-D: Curso temporal de la amplitud y velocidad máxima de los sacádicos *on* (A y C, respectivamente) u *off* (B y D, respectivamente) del ojo homolateral a la lesión del TAD (línea verde) o del FLM (línea azul) a corto (cp, colores claros) o largo plazo (lp, colores oscuros) durante movimientos oculares espontáneos. Se representan los valores medios \pm EEM; $147 \leq n \leq 439$ (n = número de sacádicos) y se ilustran las diferencias significativas respecto al control (*), entre corto y largo plazo dentro de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#; $p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak).

En conclusión, tras la sección selectiva del TAD o del FLM, los movimientos oculares espontáneos se vieron afectados tanto en amplitud como en el grado de conjugación de los mismos. Sin embargo, y aunque en ambos casos se observó una evolución temporal, solo los animales carentes de la aferencia vestibular recuperaron completamente la motilidad previa a la lesión.

4.2.3. Movimientos oculares durante el reflejo vestíbulo-ocular

Se estudió el comportamiento ocular durante el reflejo vestíbulo-ocular en control y tras la axotomía del TAD o del FLM. La rotación de la cabeza produjo movimientos oculares compensatorios (fases lentas del reflejo vestíbulo-ocular), de amplitud similar pero dirección opuesta a la de la cabeza. Las fases rápidas de recentrado ocular se realizaron en dirección opuesta a las fases lentas e igual al movimiento de la cabeza. Así, cuando la cabeza se movió hacia la izquierda, los movimientos compensatorios del ojo fueron dirigidos hacia la derecha y las fases rápidas hacia la izquierda. Durante el nistagmo vestibular las fases lentas y rápidas se sucedieron de forma conjugada en ambos ojos. Considerando que nuestro estudio se centró en los efectos producidos tras la deaferentación del recto medial derecho, nos referiremos como hemicíclon *on* a aquellos donde las fases lentas se dirigieron en la dirección de activación (izquierda) y las fases rápidas se dirigían en la dirección de inactivación (derecha), mientras que en los hemicíclon *off*, las fases lentas se dirigieron hacia la derecha y las fases rápidas hacia la izquierda (Figura 17).

En la figura 17A-E, se representa la velocidad ocular (grados/s), obtenida al derivar la posición ocular de los ojos homolateral (línea continua) y contralateral (línea discontinua) a la lesión. La velocidad de la cabeza se representa invertida por la línea roja. En control (Figura 17A), se observó un solapamiento muy exacto, al superponer los registros de la velocidad ocular de ambos ojos y de la cabeza. A corto plazo tras la sección unilateral del TAD, se observó que el ojo afectado presentaba una amplitud reducida tanto en las fases rápidas como lentas del reflejo vestíbulo-ocular, siendo la reducción ligeramente más prominente en los hemicíclon *on* (Figura 17B, línea verde claro). A pesar de ello, a partir de la primera semana tras la lesión del TAD, se vio una recuperación en la motilidad del ojo afectado, tanto en las velocidades *on* como *off*, presentando un comportamiento similar al de la situación control (Figura 17C, línea verde oscuro). La sección del FLM derecho, tanto a corto (Figura 17D, línea azul claro) como largo plazo (Figura 17E, línea azul oscuro) produjo una reducción en la amplitud de movimientos del ojo homolateral a la lesión tanto en los hemicíclon *on* como en los *off*. El ojo control, contralateral al sitio de lesión, no se vio afectado tras la sección del TAD o del FLM.

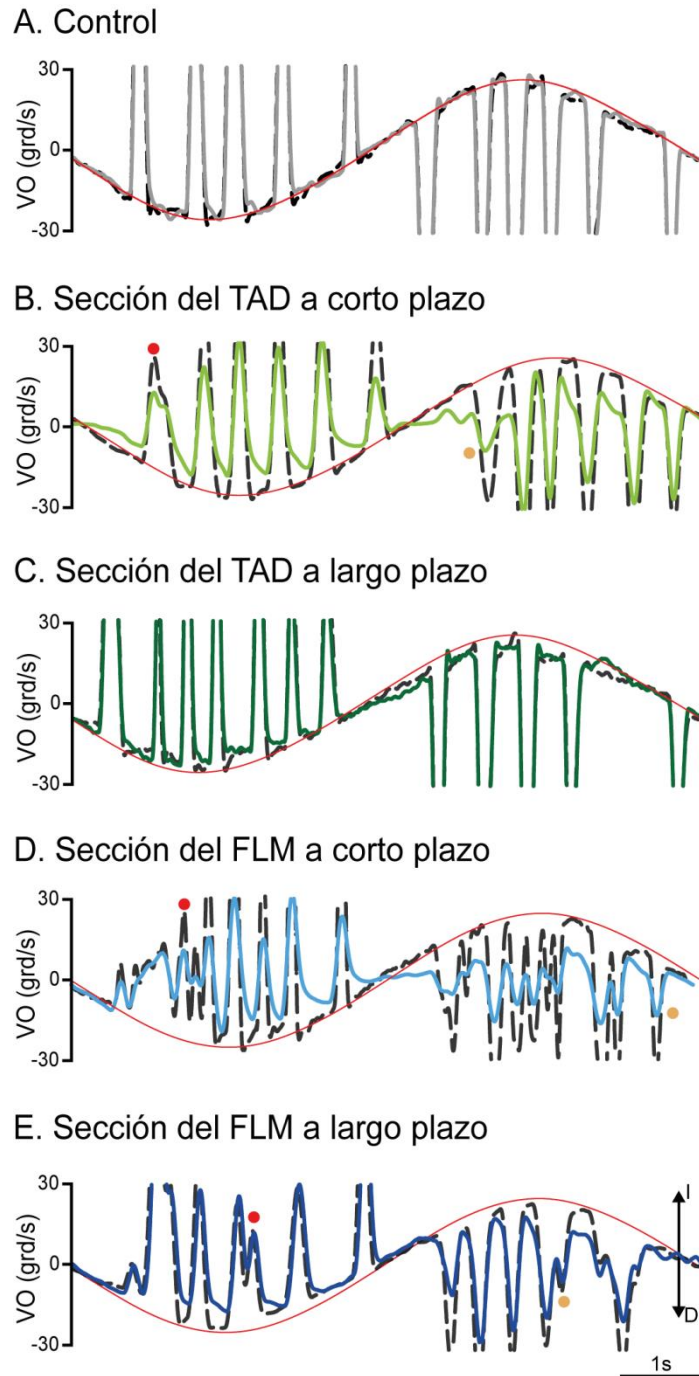


Figura 17. Cambios en los movimientos oculares durante el reflejo vestibulo-ocular en respuesta a la sección unilateral del TAD o del FLM. Registros de la velocidad ocular horizontal (VO, en grados/s) en control (A), 1 o 26 días tras la sección unilateral del TAD (B y C, respectivamente) o del FLM (D y E, respectivamente) durante el reflejo vestibulo-ocular. Las líneas continuas y discontinuas representan la velocidad del ojo homolateral y contralateral al sitio de la lesión, respectivamente. I y D indican la dirección de movimiento del ojo, hacia la izquierda o hacia la derecha, respectivamente. Los puntos naranjas y rojos indican ejemplos de reducciones en las fases rápidas del ojo lesionado con respecto al ojo control, en dirección *on* (rojo) y *off* (naranja).

4.2.4. Movimientos oculares durante el reflejo vestibulo-ocular: Análisis

Los movimientos oculares horizontales durante estimulación vestibular en control y tras la deaferentación selectiva se analizaron midiendo la ganancia ocular (Figura 18A), así como la amplitud de la velocidad de los movimientos rápidos durante los hemicíclios *on* y *off* del reflejo vestibulo-ocular (Figura 18B y C, respectivamente).

La ganancia del reflejo se midió como el cociente entre la velocidad pico del ojo y de la cabeza durante las fases lentas del reflejo vestibulo-ocular. La ganancia media del ojo control ($0,90 \pm 0,02$, $n = 47$ periodos de 100 s de movimientos oculares durante estimulación vestibular) fue significativamente mayor ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak, para comparaciones múltiples) que la medida en los primeros días tras la axotomía del TAD ($0,78 \pm 0,03$, $n = 27$, línea verde claro) o del FLM ($0,52 \pm 0,03$, $n = 20$, línea azul claro). A partir de 16 días tras la sección del TAD, los valores de la ganancia se recuperaron funcionalmente ($0,93 \pm 0,01$, $n = 51$, intervalo 16-25 días), siendo similares ($p = 0,272$) a la situación control. Sin embargo, hasta al menos 2 meses tras la lesión, los animales con el FLM seccionado siguieron manteniendo una ganancia significativamente menor a la medida en control ($0,72 \pm 0,07$, $n = 26$, $p < 0,001$; Figura 18A, línea azul oscuro). Entre ambas lesiones, se observaron diferencias significativas en todos los rangos temporales medidos ($p < 0,001$), siendo más severos los efectos de la lesión en los animales con el FLM seccionado.

La amplitud de las fases rápidas se midió tanto durante los hemicíclios *on* como durante los *off* (Figura 18B y C, respectivamente). La velocidad media de las fases rápidas en los hemicíclios *on* control ($101,2 \pm 2,2$ grados/s, $n = 106$ ciclos) fue significativamente mayor ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) que la registrada durante la primera semana tras la sección unilateral del TAD ($61,3 \pm 1,5$ grados/s, $n = 245$) o del FLM ($33,8 \pm 2,1$ grados/s, $n = 50$), siendo más pronunciado el efecto de la lesión en el FLM ($p < 0,001$), donde se registraron velocidades *on* menores que en los animales con lesión en el TAD (Figura 18B). En la figura 18B, se observa que conforme aumentan los días tras la lesión, la amplitud de las fases rápidas en los hemicíclios *on* aumenta, pero solo los animales con el TAD seccionado consiguen una recuperación completa entre 16-25 días tras la lesión ($99,8 \pm 2,2$ grados/s, $n = 127$, $p = 0,613$). A largo plazo, los animales con el FLM seccionado presentaron amplitudes *on* ($74,9 \pm 1,9$ grados/s, $n = 60$) aun significativamente menores que los animales con lesión en el TAD ($96,7 \pm 1,7$ grados/s, $n = 124$, $p < 0,001$) en el mismo punto temporal y que durante control.

La velocidad de las fases rápidas durante los hemicícllos *off* tras la sección del TAD o del FLM se afectó de la misma forma, aunque en menor grado, que los hemicícllos *on* (Figura 18C). Se observó una marcada reducción a corto plazo en ambas lesiones, cuando se comparó con el control ($96,7 \pm 1,9$ grados/s, $n = 106$, $p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples), existiendo diferencias ($p < 0,001$) entre los animales con lesión en el TAD ($74,2 \pm 0,9$ grados/s, $n = 245$) y el FLM ($53,5 \pm 3,5$ grados/s, $n = 50$). Al igual que las fases rápidas durante los hemicícllos *on*, se produjo una recuperación de las velocidades *off* durante el reflejo vestibulo-ocular, que fue completa solo para los animales privados de la proyección vestibular, a partir de 16-25 días post-lesión ($92,5 \pm 1,4$ grados/s, $n = 127$, $p = 0,064$), mientras que, al menos dos meses tras la lesión, los animales a los que se les seccionó el FLM seguían mostrando valores de velocidades *off* menores que control y que los animales con lesión en el TAD ($78,4 \pm 2,4$ grados/s, $n = 60$, $p < 0,001$).

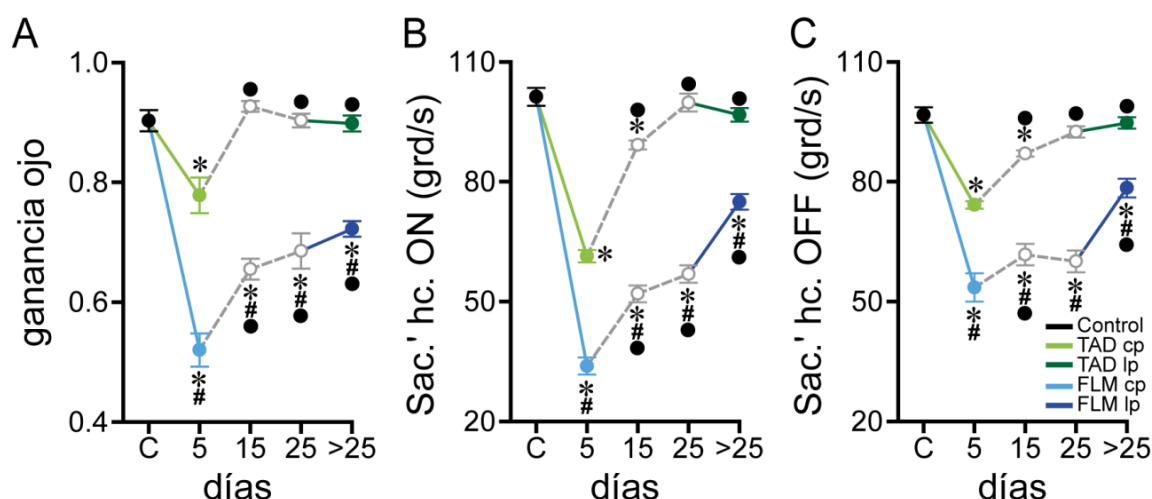


Figura 18. Análisis estadístico de los movimientos oculares durante el reflejo vestibulo-ocular tras la deaferentación selectiva. Curso temporal de cambios en la ganancia (A) y en la amplitud de las fases rápidas durante los hemicícllos *on* (B, en grados/s) u *off* (C, en grados/s) del ojo homolateral a la lesión del TAD (línea verde) o del FLM (línea azul) durante el reflejo vestibulo-ocular. Se señalan los valores a corto (cp) y largo plazo (lp) con colores claros y oscuros, respectivamente. Los plazos intermedios están representados en gris. Se representan las medias \pm EEM; $20 \leq n \leq 51$ para la ganancia ($n =$ intervalos de 100 s de reflejo vestibulo-ocular analizados); $42 \leq n \leq 339$ ($n =$ hemicícllos *on* y *off* analizados para la amplitud de las fases rápidas durante estimulación vestibular). Se ilustran las diferencias significativas respecto al control (*), respecto al corto plazo dentro de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#; $p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak).

Por tanto, tras la sección unilateral del TAD o del FLM, los movimientos oculares durante el reflejo vestibulo-ocular se vieron sensiblemente afectados, tanto en las fases rápidas como en las lentas, durante los hemicícllos *on* y *off*, y aunque los efectos de ambas lesiones mejoraron con el tiempo, solo los animales con lesión en el TAD recuperaron los valores previos a la misma.

4.3. Efectos de la deaferentación selectiva sobre el patrón de disparo de las motoneuronas del recto medial

La actividad eléctrica de las motoneuronas del recto medial se registró antes y a diferentes tiempos tras la sección unilateral del TAD o el FLM derecho. Se describen y comparan, a continuación, los patrones de actividad de dichas motoneuronas, en animales alerta, en la situación control y tras la lesión del TAD o del FLM durante diferentes tipos de movimientos oculares: fijaciones, movimientos oculares sacádicos, inducidos por estimulación vestibular (reflejo vestíbulo-ocular) y movimientos de vergencia espontáneos.

4.3.1. Aspectos cualitativos del patrón de disparo de las motoneuronas del recto medial durante movimientos oculares espontáneos

Las motoneuronas controles presentaron una tasa de disparo tónico-fásica durante los movimientos oculares espontáneos: el componente tónico se observó durante las fijaciones, correlacionado con la posición ocular, mientras que el componente fásico se desencadenó durante los movimientos sacádicos, correlacionado con la velocidad ocular. Por lo tanto, la frecuencia de disparo codificó tanto la posición como la velocidad con la que los ojos se movían (Figura 19A). Así, durante las fijaciones oculares, estas neuronas mantuvieron una tasa de disparo regular, proporcional a la posición del ojo en la órbita, donde la frecuencia fue más alta en posiciones más nasales (dirección de activación, *on*, contralateral al registro, izquierda) y disminuyó durante las fijaciones progresivamente más laterales (dirección de inactivación, *off*, homolateral al registro, derecha). Además, durante los movimientos sacádicos en la dirección de activación, emitieron brotes de potenciales de acción de alta frecuencia, codificando su velocidad (Figura 19A, asterisco). Por el contrario, la tasa de disparo disminuyó brusca y proporcionalmente a la velocidad ocular durante movimientos sacádicos en la dirección de inactivación (Figura 19A, punto).

La deaferentación selectiva produjo alteraciones en el patrón de disparo de las motoneuronas del recto medial, afectando a la modulación relacionada tanto con la posición como con la velocidad ocular, que difirieron dependiendo del tipo de lesión. Estas alteraciones fueron notables desde el mismo momento en que se produjo la lesión, de modo que se redujo sensiblemente la tasa de disparo de las motoneuronas del recto medial durante las fijaciones en cualquier posición de la órbita (Figura 19B y C, respectivamente). Además, disminuyó considerablemente la amplitud de los brotes de espigas durante los movimientos sacádicos *on*

(Figura 19B y C, asteriscos). Por otro lado, los movimientos rápidos en la dirección *off*, se asociaron a menores disminuciones en el disparo neuronal, incluso implicando a veces pausas completas del mismo (Figura 19B y C, puntos). Sin embargo, a largo plazo tras la sección del TAD, se observó una recuperación del patrón de descarga (Figura 19D), con una tasa de disparo y una modulación de los movimientos sacádicos de aducción (Figura 19D, asterisco) y abducción (Figura 19D, punto), similares a las que se registraron durante la situación control. En animales con el FLM seccionado, no se vieron diferencias cualitativas en el patrón de disparo entre los primeros días (corto plazo, no mostrado) y más de 25 días tras la lesión (largo plazo, Figura 19B).

4.3.2. Análisis de las propiedades de disparo durante fijaciones oculares

Para analizar la actividad tónica de las motoneuronas del recto medial, de cada célula analizada, se seleccionaron valores simultáneos de posición ocular y de la frecuencia instantánea de disparo durante las fijaciones oculares, prestando especial atención a que el muestreo de datos recogiera el rango más amplio posible de fijaciones en distintas posiciones de la órbita.

Durante los primeros días tras la deaferentación selectiva, la pendiente de las rectas de regresión fue menor (Figura 20A, rectas verde y azul claro para TAD y FLM, respectivamente) que la obtenida en la situación control (Figura 20A, recta negra). A largo plazo, la pendiente de las rectas obtenidas de animales con el TAD seccionado (Figura 20A, recta verde oscuro) fue similar a la obtenida durante situación control, mientras que la de los animales con el FLM lesionado (Figura 20A, recta azul oscuro) continuó siendo menor que las rectas control. Esto se traduce en menores sensibilidades neuronales a la posición ocular durante los primeros 5 días tras la axotomía del TAD o del FLM ($2,8 \pm 0,2$ y $1,7 \pm 0,2$ pa/s/grado, $n = 34$ y $n = 13$ células, respectivamente, $p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) frente a las obtenidas en control ($4,4 \pm 0,1$ pa/s/grado, $n = 98$; Figura 20B). Sin embargo, se observó una recuperación funcional en los animales con el TAD seccionado a partir de 6 días tras la lesión ($3,8 \pm 0,2$ pa/s/grado, $n = 33$, intervalo 6-15 días), que no fue distinta del valor obtenido en control ($p = 0,050$) y que se mantuvo así hasta el final del experimento ($4,2 \pm 0,3$ pa/s/grado, $n = 23$, $p = 0,534$, largo plazo). Además, los valores de k_s a corto y largo plazo en los animales privados de la proyección vestibular fueron significativamente diferentes ($p < 0,001$; Figura 20B). Esta recuperación funcional no se presentó en animales con el FLM lesionado, donde el valor promedio de la k_s se mantuvo inferior al control hasta 2 meses tras la lesión ($2,8 \pm 0,2$ pa/s/grado, $n = 21$, $p < 0,001$), sin observarse diferencias entre los diferentes periodos temporales analizados (Figura 20B).

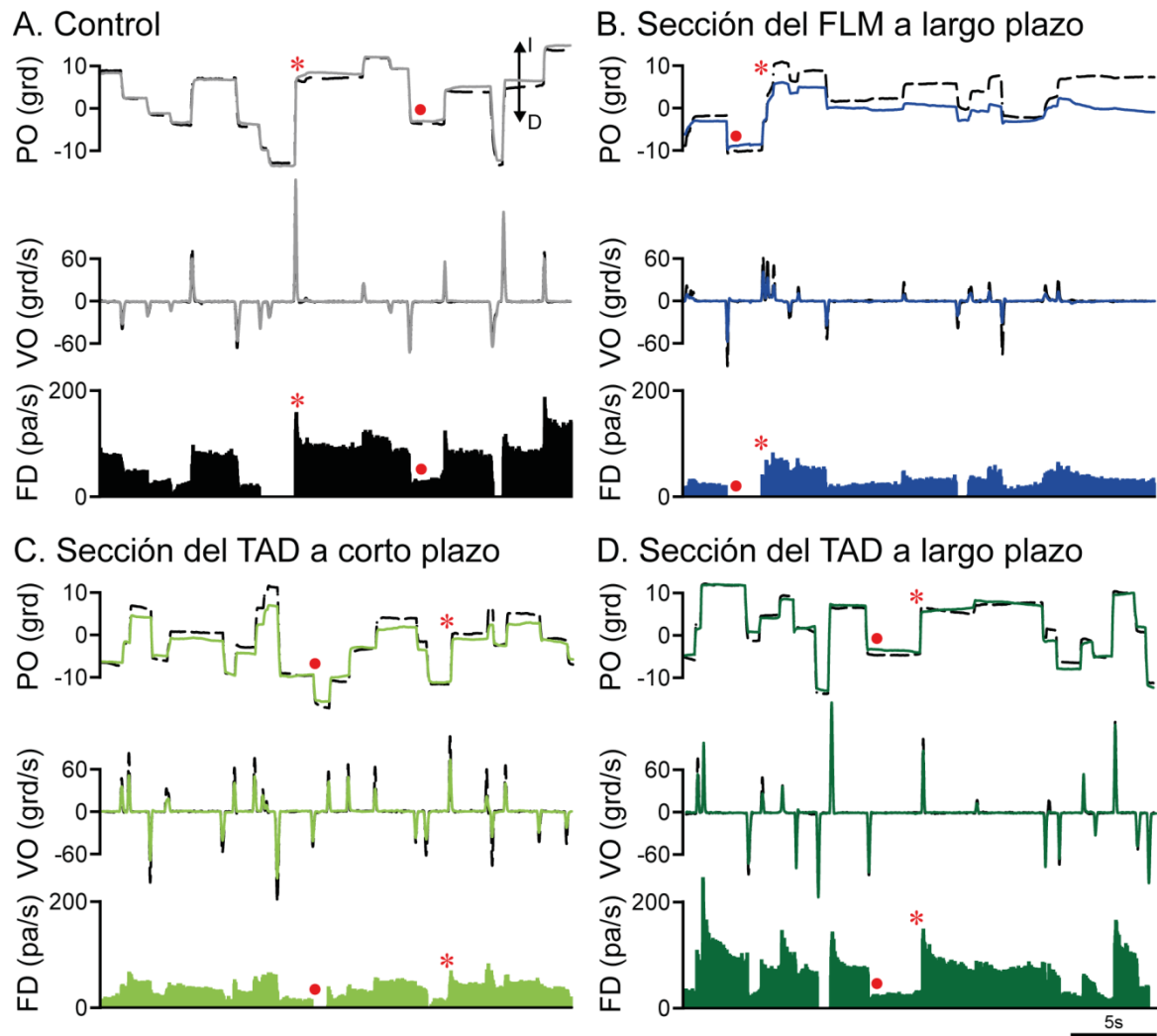


Figura 19. Disparo de las motoneuronas del recto medial derecho durante movimientos oculares espontáneos. En cada panel se ilustra, desde arriba hacia abajo, el registro de la posición ocular (PO, en grados) y la velocidad ocular (VO, en grados/s) del ojo control (línea discontinua) y del ojo homolateral al lado de lesión (línea continua) en el plano horizontal, así como la frecuencia instantánea de disparo (FD, en potenciales de acción/s) para una célula registrada en situación control (**A**, negro), 30 días tras la axotomía del FLM (**B**, azul), y 2 o 39 días tras la sección del TAD (**C**, verde claro y **D**, verde oscuro, respectivamente) durante movimientos oculares espontáneos. I y D indican la dirección de movimiento del ojo hacia la izquierda o hacia la derecha, respectivamente. Los asteriscos y los puntos indican ejemplos de movimientos oculares sacádicos *on* (hacia la dirección de activación, izquierda) y *off* (hacia la dirección de inactivación, derecha), respectivamente.

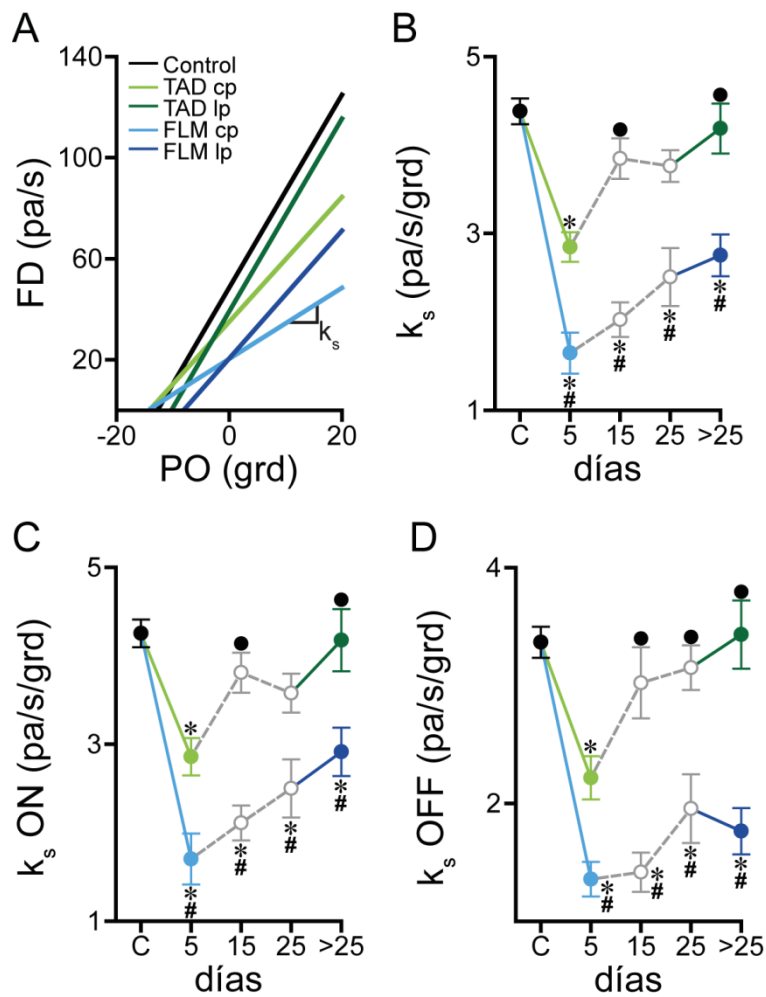


Figura 20. Cambios en la sensibilidad neuronal a la posición ocular durante movimientos espontáneos.

A: Ejemplos de regresión lineal entre la frecuencia de disparo (FD, en potenciales de acción/s) de motoneuronas del recto medial derecho y la posición ocular (PO, en grados) en la situación control (línea negra), 2 (línea verde claro, cp) o 39 días (línea verde oscuro, lp) tras la sección del TAD y 4 (línea azul claro, cp) o 30 días (línea azul oscuro, lp) tras la sección del FLM. La pendiente de la recta de regresión representa la sensibilidad neuronal a la posición ocular (k_s , en potenciales de acción/s/grado). **B-D:** Evolución en el tiempo de los valores medios \pm EEM de k_s (**B**), k_s on (**C**, calculada en fijaciones posteriores a movimientos del ojo en la dirección de activación) y k_s off (**D**, calculada en fijaciones posteriores a movimientos del ojo en la dirección de inactivación) tras la axotomía del TAD (línea verde) o del FLM (línea azul) con respecto al control (punto negro), $13 \leq n \leq 98$ (n = células analizadas). Se ilustran las diferencias significativas respecto al control (*), respecto al corto plazo dentro de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#; $p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak).

Por otro lado se analizaron por separado los componentes de las sensibilidades neuronales a la posición durante movimientos oculares realizados hacia la dirección *on* (k_s on) u *off* (k_s off). Los valores de k_s on (Figura 20C) y k_s off (Figura 20D) obtenidos durante la situación control ($4,3 \pm 0,2$ y $3,4 \pm 0,1$ pa/s/grado, respectivamente, $n = 98$ células) fueron estadísticamente superiores ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) a los obtenidos tras la sección del TAD ($2,9 \pm 0,2$ y $2,2 \pm 0,2$

pa/s/grado, respectivamente, $n = 34$) y del FLM ($1,7 \pm 0,3$ y $1,4 \pm 0,1$ pa/s/grado, respectivamente, $n = 13$) a corto plazo, como ya ocurriese con la k_s global. Nuevamente, sólo en los animales con el TAD seccionado se observó una recuperación funcional con el tiempo, siendo similar al control 6 días tras la lesión tanto la k_s *on* ($3,8 \pm 0,2$ pa/s/grado, $n = 33$, $p = 0,135$, intervalo 6-15 días) como k_s *off* ($3,0 \pm 0,3$ pa/s/grado, $n = 33$, $p = 0,177$, intervalo 6-15 días), y manteniéndose así a largo plazo ($4,2 \pm 0,4$ y $3,4 \pm 0,3$ pa/s/grado, $n = 23$, $p = 0,821$ y $p = 0,824$, respectivamente). Por el contrario, igual que ocurrió con la k_s , no se vio una recuperación de las k_s *on* y k_s *off* con el tiempo tras la lesión del FLM, permaneciendo diferentes del control a largo plazo ($2,9 \pm 0,3$ y $1,8 \pm 0,2$ pa/s/grado, respectivamente, $n = 21$, $p < 0,001$). Por otro lado, mientras que en los animales con lesión en el TAD se observaron diferencias significativas entre corto y largo plazo en los valores k_s *on* y k_s *off* ($p < 0,001$); los animales con el FLM seccionado no presentaron una evolución temporal.

4.3.3. Análisis de las propiedades de disparo durante movimientos sacádicos

En la figura 21A, se representa la recta de regresión de una célula ejemplo para cada situación experimental, resultante de enfrentar la frecuencia instantánea de disparo, tras sustraerle el componente de posición, frente a la velocidad ocular simultánea durante los movimientos sacádicos. Se han excluido de la gráfica las nubes de puntos por claridad. Se aprecia que, a corto plazo, tras la sección unilateral del TAD (recta verde claro) o del FLM (recta azul claro), la pendiente de la recta de regresión fue menor que la obtenida en control (recta negra). A largo plazo, al menos 25 días tras la lesión, solo las motoneuronas privadas de la señal vestibular (recta verde oscuro) se recuperaron, donde la pendiente de la recta de regresión fue similar a control, mientras que las células que carecían de la entrada procedente del NMOE (recta azul oscuro) mantuvieron una recta de regresión menor que el control y que células registradas en animales con el TAD seccionado (Figura 21A).

Las motoneuronas del recto medial controles presentaron una sensibilidad neuronal a la velocidad ocular ($0,48 \pm 0,02$ pa/s/grado/s, $n = 98$ células) que fue significativamente mayor ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) que la obtenida en motoneuronas registradas a corto plazo tras la sección unilateral del TAD o del FLM ($0,28 \pm 0,02$ y $0,15 \pm 0,02$ pa/s/grado/s, $n = 34$ y $n = 13$, respectivamente; Figura 21B). A partir de 16 días tras la sección del TAD, la sensibilidad neuronal a la velocidad, se recuperó, sin encontrarse diferencias con el control ($0,42 \pm 0,03$ pa/s/grado/s, $n = 22$, $p = 0,074$, para el intervalo 16-25 días). Sin embargo, los animales con lesión en el FLM mantuvieron una r_s menor ($p < 0,001$) que

el control (Figura 21B) en todos los periodos de tiempo registrado ($0,21 \pm 0,02$ pa/s/grado/s, $n = 21$, largo plazo).

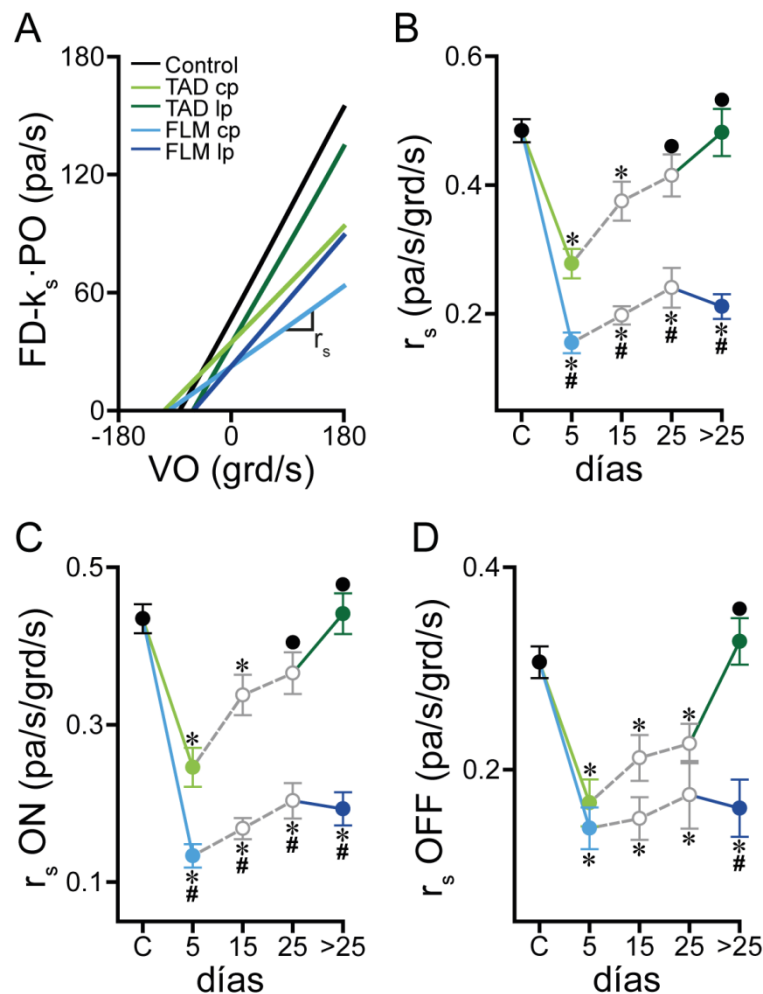


Figura 21. Cambios en la sensibilidad neuronal a la velocidad ocular durante movimientos espontáneos del ojo. **A:** Ejemplos de rectas de regresión lineal entre la frecuencia de disparo obtenida tras sustraer el componente de posición ($FD-k_s \cdot PO$), en potenciales de acción/s y la velocidad ocular (VO , en grados/s), durante movimientos sacádicos, para motoneuronas del recto medial en las diferentes situaciones experimentales: control (recta negra), 3 (recta verde claro, cp) o 39 días (recta verde oscuro, lp) tras la sección del TAD o bien 4 (recta azul claro, cp) o 30 días (recta azul oscuro, lp) tras la axotomía del FLM. La pendiente de la recta de regresión obtenida representa la sensibilidad neuronal a la velocidad ocular (r_s , en potenciales de acción/s/grados/s). **B-D:** Curso temporal comparando los valores medios \pm EEM de r_s (**B**), $r_s ON$ (**C**, calculada cuando el ojo se mueve hacia la dirección de activación) y $r_s OFF$ (**D**, calculada cuando el ojo se mueve hacia la otra dirección) tras la lesión del TAD (línea verde) o del FLM (línea azul) con respecto al control (punto negro). $13 \leq n \leq 98$ células. Se ilustran las diferencias significativas respecto al grupo control (*), respecto al corto plazo dentro de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#; $p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak).

Al igual que para el análisis realizado con la sensibilidad a la posición ocular, se cuantificó la sensibilidad neuronal a la velocidad ocular durante movimientos sacádicos en la dirección *on* (Figura 21C) o en la dirección *off* (Figura 21D). La $r_s ON$ se comportó de manera similar a la r_s . Así,

la sensibilidad neuronal a la velocidad ocular control durante sacádicos ($0,43 \pm 0,02$ pa/s/grado/s, $n = 98$ células) fue mayor ($p < 0,001$) que tras las lesiones en el TAD o el FLM a corto plazo ($0,25 \pm 0,02$ y $0,13 \pm 0,01$ pa/s/grado/s, $n = 34$ y $n = 13$, respectivamente), recuperándose funcionalmente la r_s on en los animales con lesión en el TAD ($0,37 \pm 0,03$ pa/s/grado/s, $n = 22$, $p = 0,076$, intervalo 16-25 días) y manteniéndose disminuida en el tiempo en animales sin la proyección del NMOE ($0,19 \pm 0,02$ pa/s/grado/s, $n = 21$, $p < 0,001$, a largo plazo; Figura 21C). Además, en los animales con el TAD seccionado, tanto los valores promedio de r_s como de r_s on fueron diferentes, a partir de 16 días tras la lesión, de los valores obtenidos a corto plazo. Por otro lado, en todos los rangos temporales analizados, hubo diferencias entre las lesiones en el TAD y el FLM en ambos valores (Figura 21B y C). Por otra parte, el valor promedio de la r_s off disminuyó a corto plazo ($0,17 \pm 0,02$ y $0,14 \pm 0,02$ pa/s/grado/s, $n = 34$ y $n = 13$, $p < 0,001$, respectivamente) en comparación con el control ($0,31 \pm 0,02$ pa/s/grado/s, $n = 98$). De nuevo, solo los animales privados de la proyección vestibular se recuperaron funcionalmente a largo plazo tras la lesión ($0,33 \pm 0,02$ pa/s/grado/s, $n = 23$, $p = 0,543$), presentando una sensibilidad a la velocidad que también fue significativamente superior al valor a corto plazo ($p < 0,001$). Por el contrario, los animales con el FLM seccionado mantuvieron las diferencias con el control a lo largo del tiempo ($p < 0,001$). Solo a largo plazo, hubo diferencias significativas entre los dos tipos de lesiones ($p < 0,001$; Figura 21D).

4.3.4. Aspectos cualitativos del patrón de disparo de las motoneuronas del recto medial durante estimulación vestibular

Se estudió el comportamiento de las motoneuronas del recto medial del NMOC durante el reflejo vestibulo-ocular en las diferentes situaciones experimentales. En control, las motoneuronas del recto medial modularon su actividad en respuesta a la estimulación vestibular. Así, el perfil de disparo mostró una modulación sinusoidal, proporcional a la posición y velocidad de los movimientos oculares durante las fases lentas, con actividad en forma de brote durante las fases rápidas en dirección contralateral, o pausas durante las fases rápidas en dirección homolateral (Figura 22A). La lesión del TAD o del FLM también alteró la tasa de disparo de las motoneuronas del recto medial durante el reflejo vestibulo-ocular, visible desde el mismo momento tras la lesión. La sección del FLM indujo una reducción en la modulación del disparo durante estimulación vestibular, con brotes de potenciales de acción de menor amplitud en comparación con el control, sin verse diferencias significativas entre corto (no mostrado) y largo plazo (Figura 22B). Por otro lado la lesión vestibular produjo efectos en el disparo de las motoneuronas del recto medial, que variaron dependiendo del tiempo tras la misma. A corto

plazo, la sección unilateral del TAD (Figura 22C) produjo efectos similares, aunque de menor magnitud, a los de la lesión del FLM a largo plazo; sin embargo, a largo plazo, se observó una recuperación de la modulación durante las fases lentas del reflejo vestibulo-ocular, así como de los brotes durante las fases rápidas, con amplitudes comparables a las observadas en la situación control (Figura 22D).

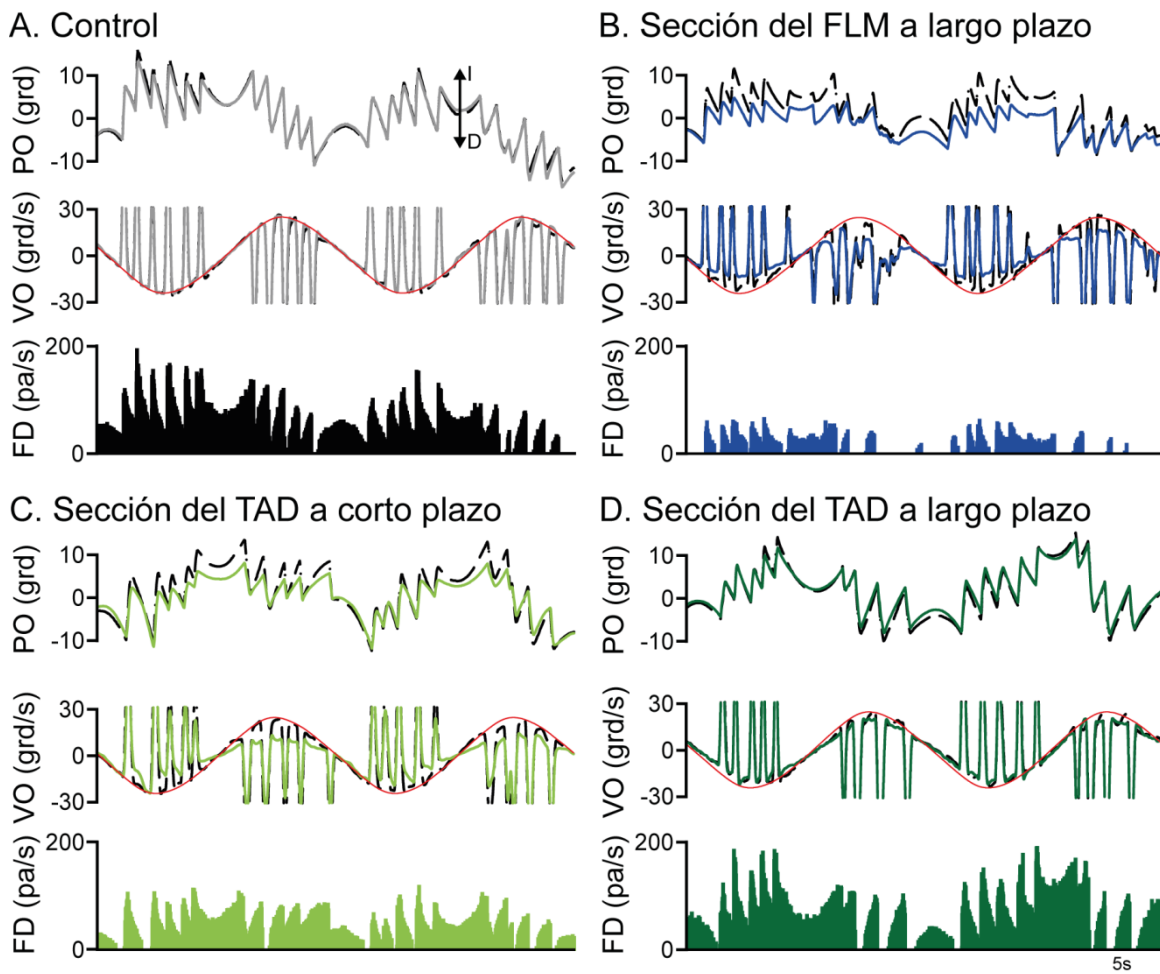


Figura 22. Disparo de las motoneuronas del recto medial durante el reflejo vestibulo-ocular. **A:** Se ilustra de arriba a abajo: registro de la posición horizontal del ojo (PO, en grados) y de la velocidad ocular (VO, en grados/s) del ojo control (línea discontinua) y del ojo afectado (línea continua) en el plano horizontal, con la superposición de la velocidad invertida de la cabeza (línea roja, en grados/s), así como la frecuencia de disparo (FD, en potenciales de acción/s) de una motoneurona del recto medial control. **B:** Lo mismo que en **A** pero para una motoneurona registrada 30 días tras la sección unilateral del FLM. El registro del ojo control se representa en negro, el afectado en color azul. **C, D:** Igual que en **A** y **B**, pero en este caso representando motoneuronas del recto medial registradas 1 (**C**, verde claro) y 44 (**D**, verde oscuro) días tras la axotomía unilateral del TAD.

4.3.5. Análisis de las propiedades de disparo durante estimulación vestibular

El análisis de la frecuencia de disparo se llevó a cabo durante las fases lentas del reflejo vestíbulo-ocular mediante un análisis de regresión múltiple. La frecuencia de disparo presentó dos componentes, uno relacionado con la velocidad y otro relacionado con la posición. Restando el componente de velocidad o el componente de posición a la tasa de disparo de las motoneuronas, y enfrentándolo a la posición o la velocidad ocular, se obtiene una recta de regresión, cuya pendiente es la sensibilidad neuronal a la posición (k_v , Figura 23A) o la velocidad ocular (r_v , Figura 24A) durante el reflejo vestíbulo-ocular, respectivamente.

Se observó que a corto plazo tras la sección del TAD (recta verde claro) o del FLM (recta azul claro), la pendiente de la recta de regresión fue menor que cuando se comparó con la situación control (recta negra), tanto para la k_v (Figura 23A) como para la r_v (Figura 24A). A largo plazo sólo las células procedentes de animales con el FLM seccionado (recta azul oscuro), presentaron una recta con una pendiente menor que el control, mientras que células con lesión vestibular exhibieron una recta de regresión similar al control (recta verde oscuro), tanto para la k_v (Figura 23A) como para la r_v (Figura 24A). Esto se relaciona con menores sensibilidades a la posición (Figura 23B) y la velocidad (Figura 24B) ocular durante el reflejo vestíbulo-ocular ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) a corto plazo tras la sección selectiva del TAD ($2,7 \pm 0,2$ pa/s/grado y $0,43 \pm 0,03$ pa/s/grado/s, respectivamente, $n = 23$ células) o del FLM ($1,6 \pm 0,3$ pa/s/grado y $0,39 \pm 0,07$ pa/s/grado/s, respectivamente, $n = 11$) cuando se compara con la situación control ($5,1 \pm 0,3$ pa/s/grado y $0,72 \pm 0,03$ pa/s/grado/s, respectivamente, $n = 56$). Por otro lado, se vio una recuperación funcional en los animales carentes de la proyección del NVL, presentando valores similares al control tanto para la sensibilidad a la posición ($4,7 \pm 0,4$ pa/s/grado, $n = 19$, $p = 0,376$, intervalo de 16-25 días; Figura 23B) como para la sensibilidad a la velocidad ($0,64 \pm 0,05$ pa/s/grado/s, $n = 24$, $p = 0,171$, intervalo 6-15 días; Figura 24B) durante estimulación vestibular, y que se mantuvo a largo plazo ($4,7 \pm 0,4$ pa/s/grado y $0,76 \pm 0,08$ pa/s/grado/s, $p = 0,439$ y $p = 0,546$, respectivamente, $n = 20$), datos que también fueron diferentes de lo obtenidos a corto plazo ($p < 0,001$). Sin embargo, en los animales carentes de la aferencia del NMOE, no se observó esta mejoría ni en la k_v (Figura 23B) ni en la r_v (Figura 24B), manteniéndose diferentes del control hasta al menos 2 meses tras la lesión ($3,1 \pm 0,4$ pa/s/grado y $0,49 \pm 0,07$ pa/s/grado/s, $p < 0,001$ y $p = 0,003$, respectivamente, $n = 13$).

Al igual que se hiciera para el análisis de la actividad neuronal durante movimientos espontáneos, se calcularon las sensibilidades a la posición y a la velocidad *on* (fases lentas hacia la dirección de activación, izquierda; Figura 23C y Figura 24C, respectivamente) y *off* (fases lentas hacia la dirección de inactivación, derecha; Figura 23D y Figura 24D, respectivamente) durante el reflejo vestibulo-ocular en las diferentes situaciones experimentales.

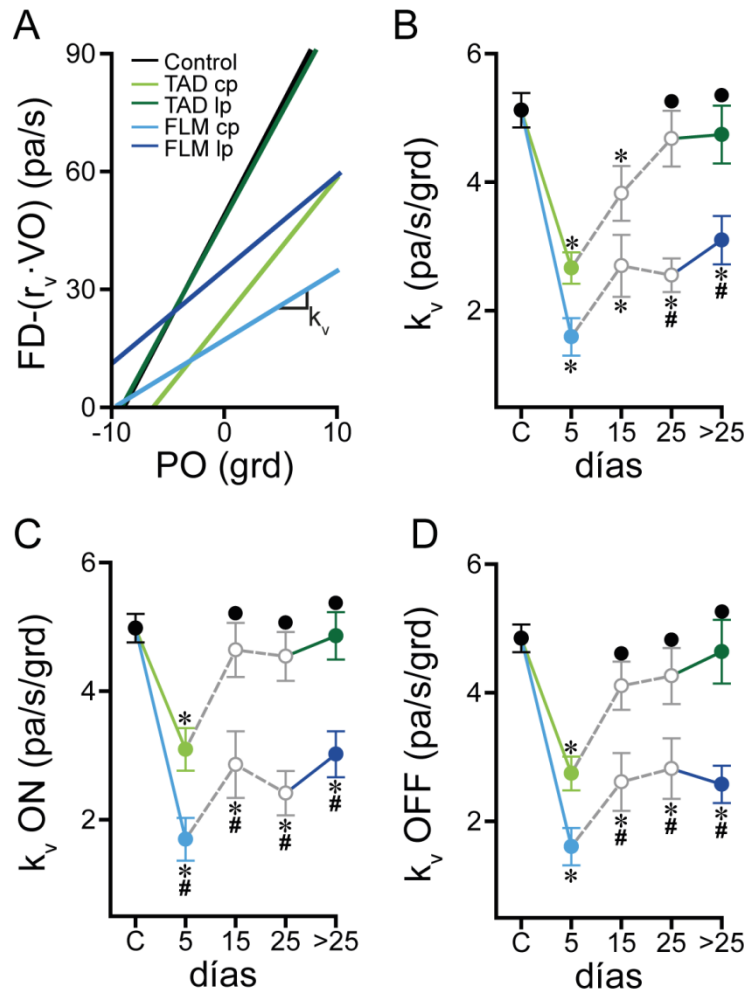


Figura 23. Curso temporal de cambios en la sensibilidad neuronal a la posición ocular durante el reflejo vestibulo-ocular. **A:** Gráfico de regresión parcial para la sensibilidad neuronal a posición ocular, donde se representa la frecuencia de disparo, a la que se le ha sustraído el componente de velocidad ($FD - r_v \cdot VO$, en potenciales de acción/s) frente a la posición ocular (PO, en grados). La pendiente de la recta de regresión obtenida es la sensibilidad neuronal a la posición ocular durante las fases lentas del reflejo vestibulo-ocular (k_v). Se representa una recta modelo para cada situación experimental: control (recta negra), sección del TAD a corto (cp, recta verde claro) y largo plazo (lp, recta verde oscuro) y lesión del FLM a corto (cp, recta azul claro) y largo plazo (lp, recta azul oscuro). **B-D:** Curso temporal comparando los valores de k_v (**B**), k_v *on* (**C**, calculada cuando el ojo se mueve hacia la dirección de activación) y k_v *off* (**D**, calculada cuando el ojo se mueve en dirección contraria) tras la axotomía del TAD o del FLM con respecto al control. Se representan los valores medios \pm EEM; $11 \leq n \leq 56$ células. Se marcan (*) las diferencias significativas respecto al grupo control, respecto a corto plazo dentro de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#; $p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak).

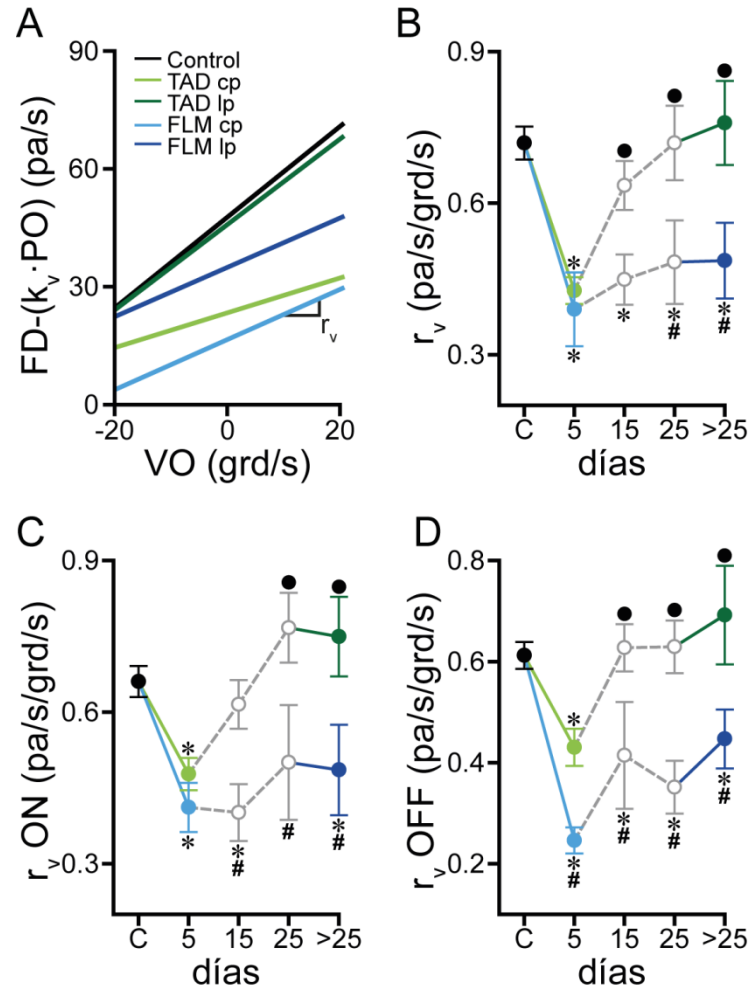


Figura 24. Curso temporal de cambios en la sensibilidad neuronal a la velocidad ocular durante el reflejo vestibulo-ocular. **A:** Gráfico de regresión parcial para la sensibilidad neuronal a velocidad ocular, donde se representa la frecuencia de disparo, a la que se le ha sustraído el componente de posición ($FD-k_v \cdot PO$, en potenciales de acción/s/grados/s) y la velocidad ocular (VO, en grados). La pendiente de la recta de regresión obtenida es la sensibilidad neuronal a la velocidad ocular durante las fases lentas del reflejo vestibulo-ocular (r_v). Se representa una recta modelo para cada situación experimental: control (línea negra), sección del TAD a corto (cp, línea verde claro) y largo plazo (lp, línea verde oscuro), o del FLM a corto (cp, línea azul claro) y largo plazo (lp, línea azul oscuro). **B-D:** Curso temporal comparando los valores de r_v (**B**), r_v on (**C**, calculada cuando el ojo se mueve hacia la dirección preferente de activación) y r_v off (**D**, calculada cuando el ojo se mueve hacia la dirección no preferente) tras la lesión del TAD (línea verde) o del FLM (línea azul) con respecto al control (punto de color negro). Se ilustran los valores medios \pm EEM; $11 \leq n \leq 56$ células. Se marcan (*) las diferencias significativas respecto al grupo control, respecto a corto plazo dentro de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#; $p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak).

A corto plazo tras la sección del TAD, se observó una disminución de las sensibilidades a la posición y la velocidad on ($3,1 \pm 0,3$ pa/s/grado y $0,48 \pm 0,03$ pa/s/grado/s, $p < 0,001$ y $p = 0,003$, respectivamente, $n = 23$ células) y off ($2,7 \pm 0,3$ pa/s/grado y $0,43 \pm 0,04$ pa/s/grado/s, $p < 0,001$ y $p = 0,001$, respectivamente, $n = 23$ células) en comparación con el control (on: $5,0 \pm 0,2$ pa/s/grado y $0,66 \pm 0,03$ pa/s/grado/s; off: $4,8 \pm 0,2$ pa/s/grado y $0,61 \pm 0,03$ pa/s/grado/s, respectivamente, $n = 56$). Sin embargo, entre 6 y 15 días tras la lesión, las células registradas,

presentaron un valor similar al control tanto en la k_v *on* y la r_v *on* ($4,6 \pm 0,4$ pa/s/grado y $0,62 \pm 0,05$ pa/s/grado/s, $p = 0,401$ y $p = 0,450$, respectivamente, $n = 24$), como en la k_v *off* y r_v *off* ($4,1 \pm 0,4$ pa/s/grado y $0,63 \pm 0,05$ pa/s/grado/s, $p = 0,065$ y $p = 0,785$, respectivamente, $n = 24$).

Por otro lado, esta mejora funcional en las sensibilidades neuronales a la posición y la velocidad *on* y *off*, no se observó en los animales con el FLM lesionado, siendo diferentes del control a corto plazo ($p < 0,001$), y manteniendo estas diferencias a largo plazo tanto para la dirección *on* ($3,0 \pm 0,4$ pa/s/grado y $0,48 \pm 0,09$ pa/s/grado/s, $p < 0,001$ y $p = 0,021$, respectivamente, $n = 13$) como la *off* ($2,6 \pm 0,3$ pa/s/grado y $0,45 \pm 0,06$ pa/s/grado/s, $p < 0,001$ y $p = 0,018$, respectivamente, $n = 13$) durante el reflejo vestibulo-ocular. Además, para un mismo punto temporal, los datos de animales privados de la entrada vestibular fueron superiores a los obtenidos en animales carentes de la proyección del NMOE, tanto en los análisis de movimientos en dirección *on* como *off* (Figuras 23B-D y 24).

Por tanto los resultados del análisis de las propiedades de disparo indicaron que tras la deaferentación selectiva, las sensibilidades neuronales a la posición y la velocidad durante movimientos espontáneos del ojo o durante estimulación vestibular se vieron reducidas con respecto a la situación control, pero los animales con el TAD seccionado recuperaron los parámetros previos a la lesión, mientras que los animales privados de la entrada del FLM mantuvieron el efecto de la lesión a lo largo del tiempo.

4.3.6. Aspectos cualitativos del patrón de disparo de las motoneuronas del recto medial durante movimientos de vergencia

Se estudió el comportamiento ocular y el disparo neuronal de las neuronas motoras del recto medial durante desplazamientos oculares de vergencia espontáneos. Se observó que durante la situación control (Figura 25A) y tras la sección unilateral del TAD (Figura 25B) o del FLM (Figura 25C) se produjeron movimientos convergentes, esto es, desplazamientos simultáneos de ambos ojos hacia una posición nasal, de manera espontánea. Además, el patrón de descarga de la motoneurona durante la convergencia correlacionó con la posición y la velocidad ocular del ojo homolateral al registro (derecho, Figura 25, asteriscos). Se analizó la aparición de movimientos divergentes espontáneos (no ilustrado), que son desplazamientos simultáneos de ambos ojos hacia posiciones laterales. Al igual que para los movimientos convergentes, la posición y la velocidad del ojo homolateral al registro correlacionaron con el disparo neuronal de la motoneurona del recto medial, tanto en la situación control como tras la

deafferentación selectiva. Estos resultados indican que ni las neuronas internucleares del NMOE ni las neuronas de Deiters codifican la información para la realización de tales movimientos, como previamente se había sugerido.

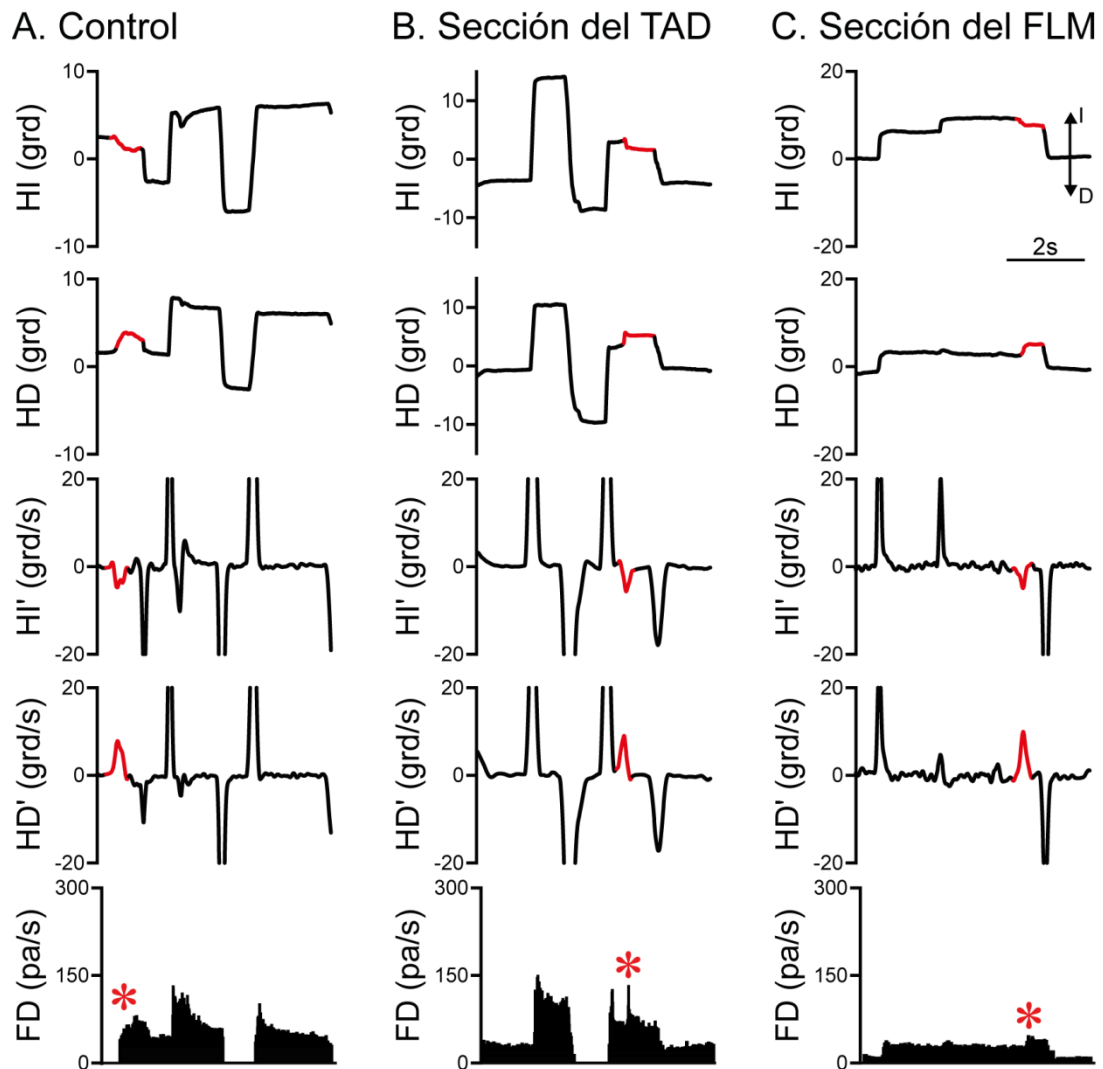


Figura 25. Disparo neuronal de las motoneuronas del recto medial durante movimientos convergentes.

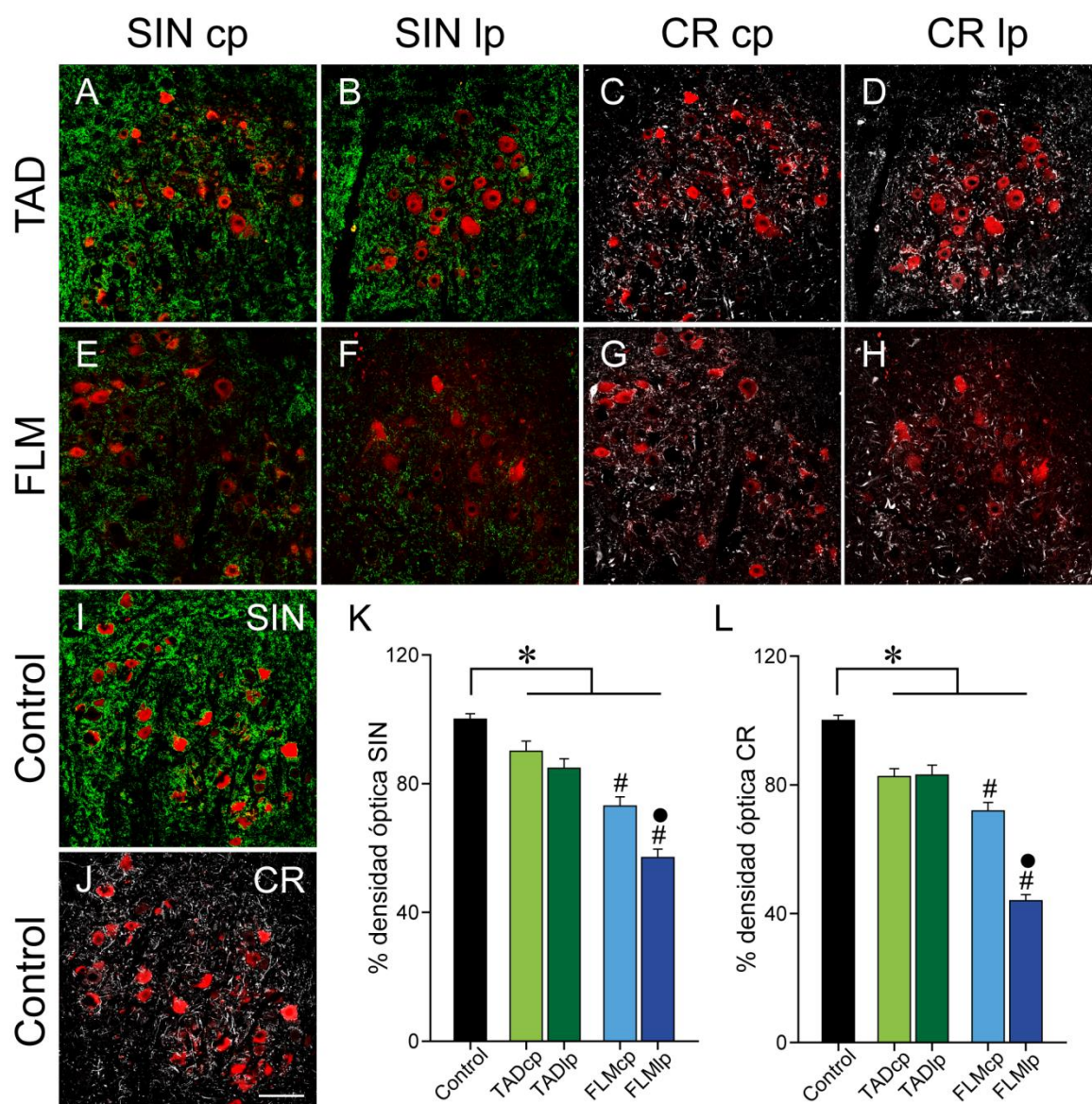
En cada panel se ilustra, desde arriba hacia abajo: el registro de la posición ocular del ojo izquierdo (HI, en grados) y del ojo derecho (HD), la velocidad ocular (HI' y HD', en grados/s) en el plano horizontal, así como la frecuencia instantánea de disparo (FD, en potenciales de acción/s) para una célula registrada en situación control (A), 15 días tras la sección del TAD (B), y 23 días tras la axotomía del FLM (C) durante desplazamientos oculares espontáneos. Se señalan en rojo, tanto en posición como en velocidad, ejemplos de movimientos convergentes. Los asteriscos señalan el disparo de la célula durante los movimientos de vergencia. Nótese la modulación del disparo con el desplazamiento del ojo homolateral al registro (derecho). I y D indican la dirección de movimiento del ojo hacia la izquierda o hacia la derecha, respectivamente.

4.4. Alteraciones sinaptológicas en las motoneuronas del recto medial tras la deaferentación selectiva

Se realizaron una serie de estudios inmunohistoquímicos mediante microscopía confocal para buscar una correlación entre las alteraciones fisiológicas de las motoneuronas del recto medial y posibles cambios en la sinaptología aferente 3 días (corto plazo) o bien 2 meses (largo plazo) tras la deaferentación selectiva.

En primer lugar, mediante microscopía confocal y una doble inmunohistoquímica contra sinaptofisina (marcador de vesículas sinápticas) y calretinina (marcador de las aferencias a las motoneuronas del recto medial) se estudiaron los cambios en la innervación del neuropilo de la población de motoneuronas del recto medial, en el lado control (Figura 26I y J), y a corto y largo plazo tras la sección unilateral del TAD (Figura 26A-D) o del FLM (Figura 26E-H), así como en el lado control de las mismas secciones (Figura 26I, J). La población de motoneuronas recto medial fue identificada mediante la rodamina inyectada en el músculo. Cualitativamente, se observó una mayor inmunorreactividad, para sinaptofisina y calretinina en el lado control respecto de las dos lesiones.

La cuantificación de la densidad óptica para sinaptofisina (Figura 26K) y calretinina (Figura 26L) mostró que tras la sección unilateral del FLM, se produjo una caída significativa ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) de la densidad óptica en el lado lesionado tanto a corto ($73,0 \pm 2,9\%$ y $71,9 \pm 2,6\%$; Figura 26K y Figura 26L, respectivamente, $n = 210$ medidas, barras azul claro) como a largo plazo ($57,0 \pm 2,7\%$ y $44,0 \pm 1,8\%$; Figura 26K y Figura 26L, respectivamente, $n = 380$, barras azul oscuro) con respecto al lado control ($100,0 \pm 1,3\%$ y $100,0 \pm 1,2\%$; Figura 26K y Figura 26L, respectivamente, $n = 1300$, barras negra), siendo más pronunciada 2 meses tras la lesión ($p < 0,001$). Por otro lado, tras la sección del TAD, el lado tratado experimentó una disminución a corto y largo plazo de la densidad óptica con respecto del control, tanto de sinaptofisina ($90,1 \pm 3,1\%$ y $84,8 \pm 3,0\%$, $p = 0,006$ y $p < 0,001$; Figura 26K y Figura 26L, respectivamente, $n = 320$, barras verde claro) como de calretinina ($82,6 \pm 2,4\%$ y $83,1 \pm 3,1\%$; Figura 26K y Figura 26L, respectivamente, $p < 0,001$, $n = 380$, barras verde oscuro), sin encontrarse diferencias entre corto y largo plazo para ninguno de los dos marcadores sinápticos usados. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de lesiones, para los dos marcadores, tanto 3 días ($p = 0,029$ y $p = 0,001$; respectivamente) como 2 meses ($p < 0,001$) tras la lesión, indicando una pérdida de entradas sinápticas más severa tras la axotomía del FLM que tras la del TAD.



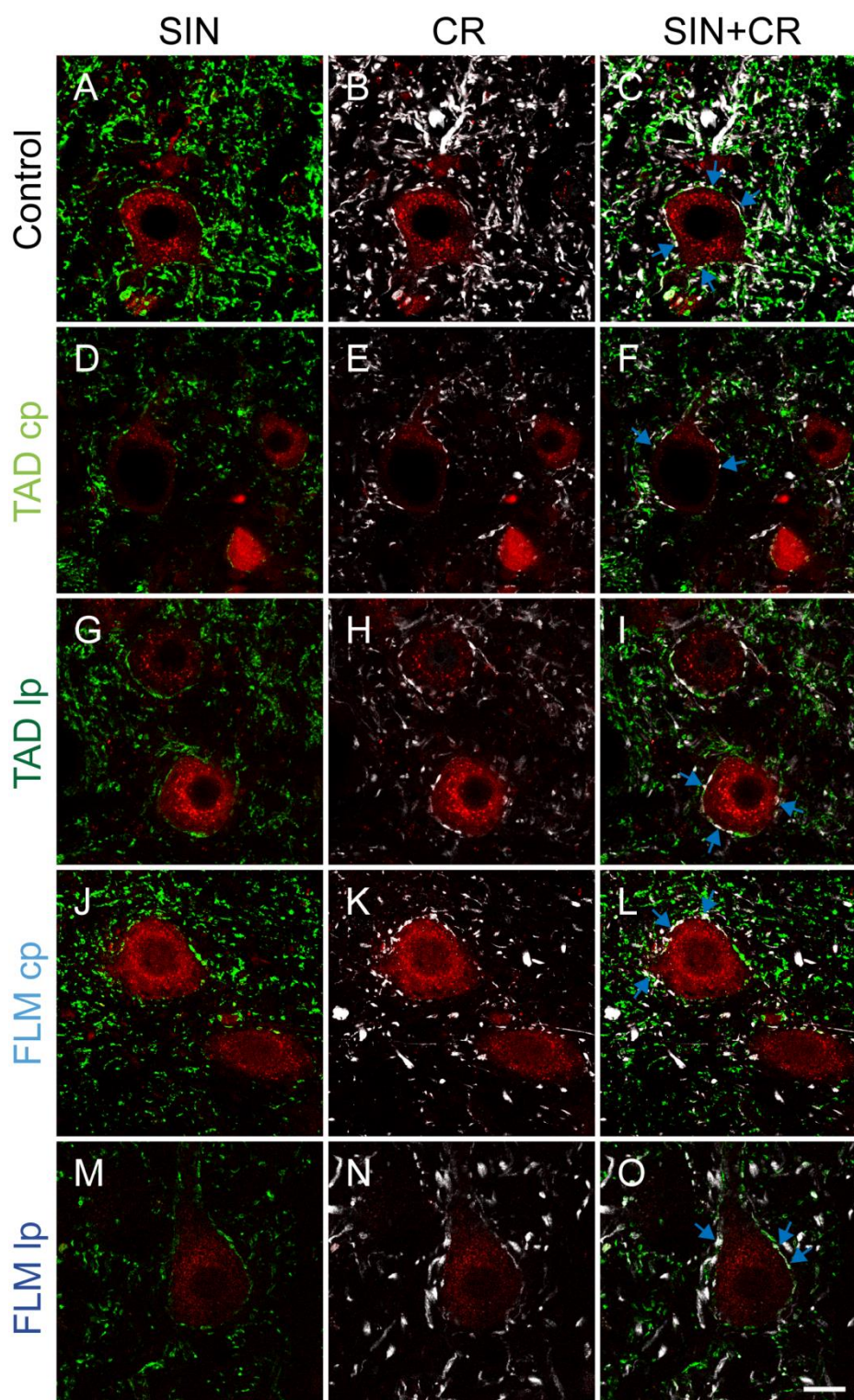


Figura 27. Consecuencias de la deaferentación de las motoneuronas del recto medial en la cobertura sináptica somática. Fotomicrografías obtenidas por microscopía confocal de motoneuronas del recto medial, identificadas mediante rodamina (rojo), y botones sinápticos inmunorreactivos frente a sinaptofisina (SIN, verde, primera columna) o calretinina (CR, blanco, segunda columna) en control (**A-C**), tras la sección unilateral del TAD, a corto (cp, **D-F**) y largo plazo (lp, **G-I**) o del FLM, a corto (**J-L**) y largo plazo (**M-O**). La tercera columna muestra la superposición de imágenes de la primera y segunda columna (SIN+CR), donde las flechas señalan botones inmunorreactivos para SIN y CR. Barra de calibración: 25 μ m.

Asimismo, se estudió, también mediante microscopía confocal, el porcentaje de perímetro somático cubierto por botones sinápticos positivos para sinaptofisina o calretinina en las motoneuronas del recto medial control (Figura 27A-C), y tras la sección, a corto y largo plazo, del TAD (Figura 27D-F y Figura 27G-I, respectivamente) o del FLM (Figura 27J-L y Figura 27M-O, respectivamente).

En la situación control las motoneuronas del recto medial presentaron un $38,2 \pm 0,5\%$ y un $29,0 \pm 0,5\%$ del perímetro somático cubierto por botones inmunopositivos para sinaptofisina ($n = 268$ células; Figura 27A; Figura 28A, barra negra) y calretinina ($n = 268$; Figura 27B; Figura 28B, barra negra), respectivamente. El número promedio de botones positivos para sinaptofisina fue de $25,5 \pm 0,4$ botones sinápticos ($n = 268$; Figura 27A; Figura 28C, barra negra), mientras que para la calretinina fue de $16,4 \pm 0,3$ botones ($n = 268$; Figura 27B; Figura 28D, barra negra). La sección del TAD o del FLM a corto plazo redujo significativamente el porcentaje de perímetro cubierto por axones terminales inmunorreactivos para sinaptofisina ($28,7 \pm 0,8\%$ y $33,4 \pm 1,2\%$, $p < 0,001$ y $p = 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples; $n = 96$ y $n = 32$, respectivamente; Figura 27D y J; Figura 28A, barras colores claros) o calretinina ($19,6 \pm 0,8\%$ y $24,5 \pm 1,0\%$, $p < 0,001$ y $p = 0,002$, $n = 96$ y $n = 32$, respectivamente; Figura 27E y K; Figura 28B, barras colores claros). Esta reducción, también se observó en ambas lesiones, en la cantidad de terminales axónicos a lo largo del perímetro celular, tanto para botones inmunopositivos para sinaptofisina ($18,2 \pm 0,6$ y $22,1 \pm 0,9$, $p < 0,001$ y $p = 0,005$, $n = 96$ y $n = 32$, para el TAD y el FLM, respectivamente; Figura 28C, barras colores claros) como calretinina ($11,0 \pm 0,4$ y $14,0 \pm 0,7$, $p < 0,001$ y $p = 0,008$, $n = 96$ y $n = 32$, para el TAD y el FLM, respectivamente; Figura 28D, barras colores claros). Además, 3 días tras la lesión, se observaron diferencias específicas entre los animales con el TAD y el FLM seccionado, tanto en el porcentaje de perímetro cubierto como en el número de botones sinaptofisina ($p < 0,001$ y $p = 0,003$, respectivamente) y calretinina ($p = 0,002$ y $p = 0,004$, respectivamente) positivos. A largo plazo, los animales carentes de la aferencia del NMOE, mantuvieron reducidos tanto el porcentaje de perímetro cubierto por terminales axónicos ($32,2 \pm 0,9\%$ para sinaptofisina y $24,8 \pm 0,9\%$ para calretinina, $p < 0,001$, $n = 71$; Figura 27M y N; Figura 28A y B, barras azul oscuro) como el número de botones ($21,1 \pm 0,9$ para sinaptofisina y $12,9 \pm 0,5$ para calretinina, $p < 0,001$, $n = 71$; Figura 28C y D, barras azul oscuro) para ambos marcadores sinápticos, sin encontrarse diferencias entre los datos obtenidos a corto y largo plazo. Sin embargo, en los animales con el TAD seccionado, se observó un aumento significativo en el perímetro somático cubierto así como en el número de botones sinápticos inmunorreactivos para sinaptofisina ($32,2 \pm 0,7\%$ y $21,0 \pm 0,6$, $p < 0,001$ y $p = 0,002$, respectivamente, $n = 101$; Figura 27G; Figura 28A y C, barras

verde oscuro) y calretinina ($22,8 \pm 0,7\%$ y $12,9 \pm 0,4$, $p = 0,003$ y $p = 0,007$, respectivamente, $n = 101$; Figura 27H; Figura 28B y D, barras verde oscuro) con respecto a corto plazo. No obstante, la recuperación de estos valores respecto a corto plazo no fue completa, y los datos 2 meses tras la deaferentación fueron diferentes de los datos control ($p < 0,001$). No se observaron diferencias a largo plazo entre ambos tipos de lesiones.

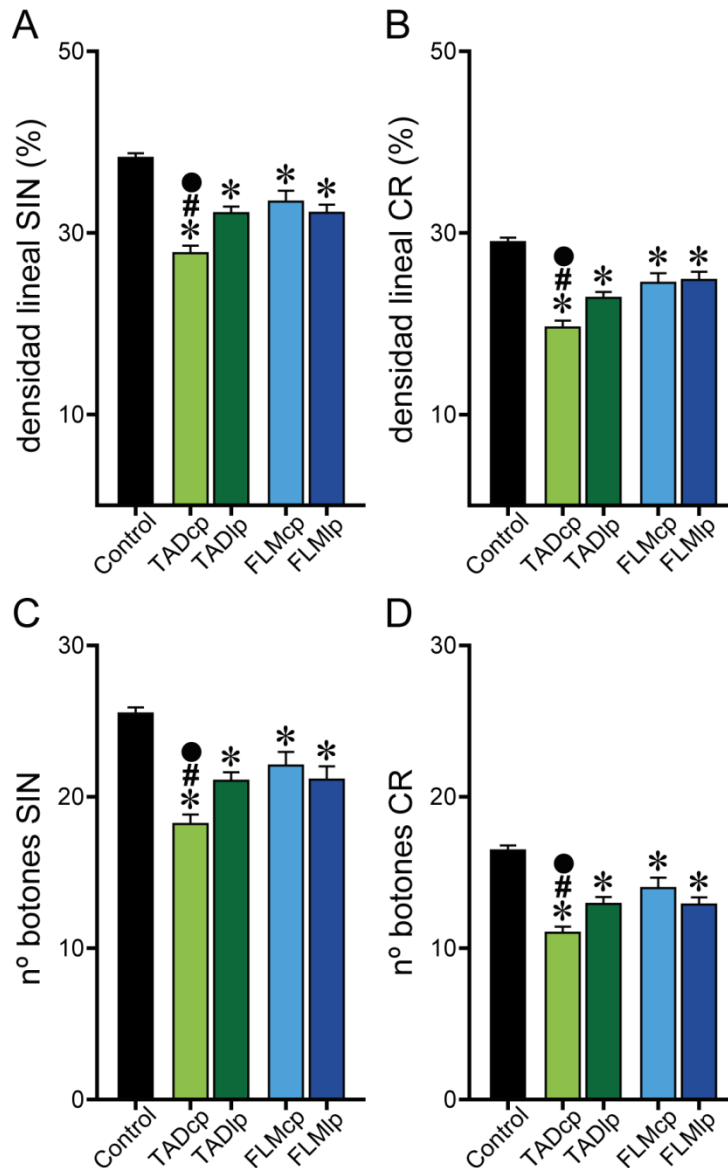


Figura 28. Análisis de los efectos de la deaferentación selectiva de las motoneuronas del recto medial en la cobertura sináptica del soma. A, B: Diagramas de barras donde se muestra el porcentaje de perímetro somático de neuronas del recto medial cubierto por botones inmunorreactivos para sinaptosina (A, SIN) o calretinina (B, CR) en las diferentes situaciones experimentales: control y sección del TAD o del FLM a corto (cp) y largo plazo (lp). Los datos se presentan como los valores medios \pm EEM; $32 \leq n \leq 268$ células. Se señalan las diferencias significativas respecto al grupo control (*), entre corto y largo plazo dentro de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#; $p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak). C, D: Diagramas de barras como en A y B, pero representando el número de botones inmunopositivos para SIN (C) o CR (D).

Este aumento en los terminales sinápticos que rodean a las motoneuronas recto mediales tras la sección del TAD está en consonancia con la recuperación funcional observada, así como con el comportamiento del ojo durante movimientos oculares espontáneos y durante estimulación vestibular.

4.5. La sección selectiva del TAD o del FLM provoca un aumento en la presencia de la proteína de crecimiento axonal GAP-43

De acuerdo a los datos presentes, dos meses tras la sección unilateral del TAD se produjo una recuperación funcional plena en las propiedades de disparo de las motoneuronas recto medial deaferentadas, llegando a valores similares a los controles, mientras que tras la lesión del FLM, esta recuperación no se produjo. Además, en estos animales, a largo plazo se observó un aumento en el número de botones, así como en el porcentaje de perímetro somático cubierto de terminales, que podría correlacionar con la recuperación funcional. Así, el siguiente objetivo fue intentar dilucidar si estos cambios sinaptológicos podrían deberse a la formación de nuevas sinapsis, por brote y crecimiento de colaterales axónicos. Para ello, se realizó un nuevo estudio por microscopía confocal, mediante tinciones inmunohistoquímicas frente a GAP-43. La GAP-43 es una proteína de crecimiento axonal, expresada en altos niveles en los conos de crecimiento axonal, siendo necesaria para el mantenimiento de la estructura y la dinámica de las nuevas fibras y terminales axónicos en crecimiento.

Las imágenes tomadas mediante microscopia confocal revelaron que la eliminación selectiva de las entradas del NVL o del NMOE a corto plazo (3 días tras la lesión) provocó un aumento en la presencia de GAP-43 en torno al neuropilo de las motoneuronas del recto medial del lado lesionado (Figura 29A y C, respectivamente), en comparación con el lado control (Figura 29E) y con su mismo tipo de lesión a largo plazo (Figura 29B y D, respectivamente). El marcaje visualizado fue una serie de prolongaciones que en algunos casos rodearon al soma de las motoneuronas con engrosamientos similares a terminales sinápticos. La cuantificación de la densidad óptica mostró un aumento significativo ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) tras la axotomía del TAD ($336,1 \pm 14,5$, $n = 258$ medidas; Figura 29F, barra verde claro) y del FLM ($179,2 \pm 8,0$, $n = 210$; Figura 29F, barra azul claro) a corto plazo, con respecto al valor control ($100,0 \pm 3,3$, $n = 889$; Figura 29F, barra negra) y a los valores a largo plazo de su misma lesión ($95,2 \pm 4,9$ y $110,9 \pm 9,3$, $n = 286$ y $n = 145$; Figura 29F, barras verde y azul oscuro, respectivamente). Además, no se vieron diferencias entre control y la sección del TAD ($p = 0,550$) o del FLM ($p = 0,306$) a largo plazo.

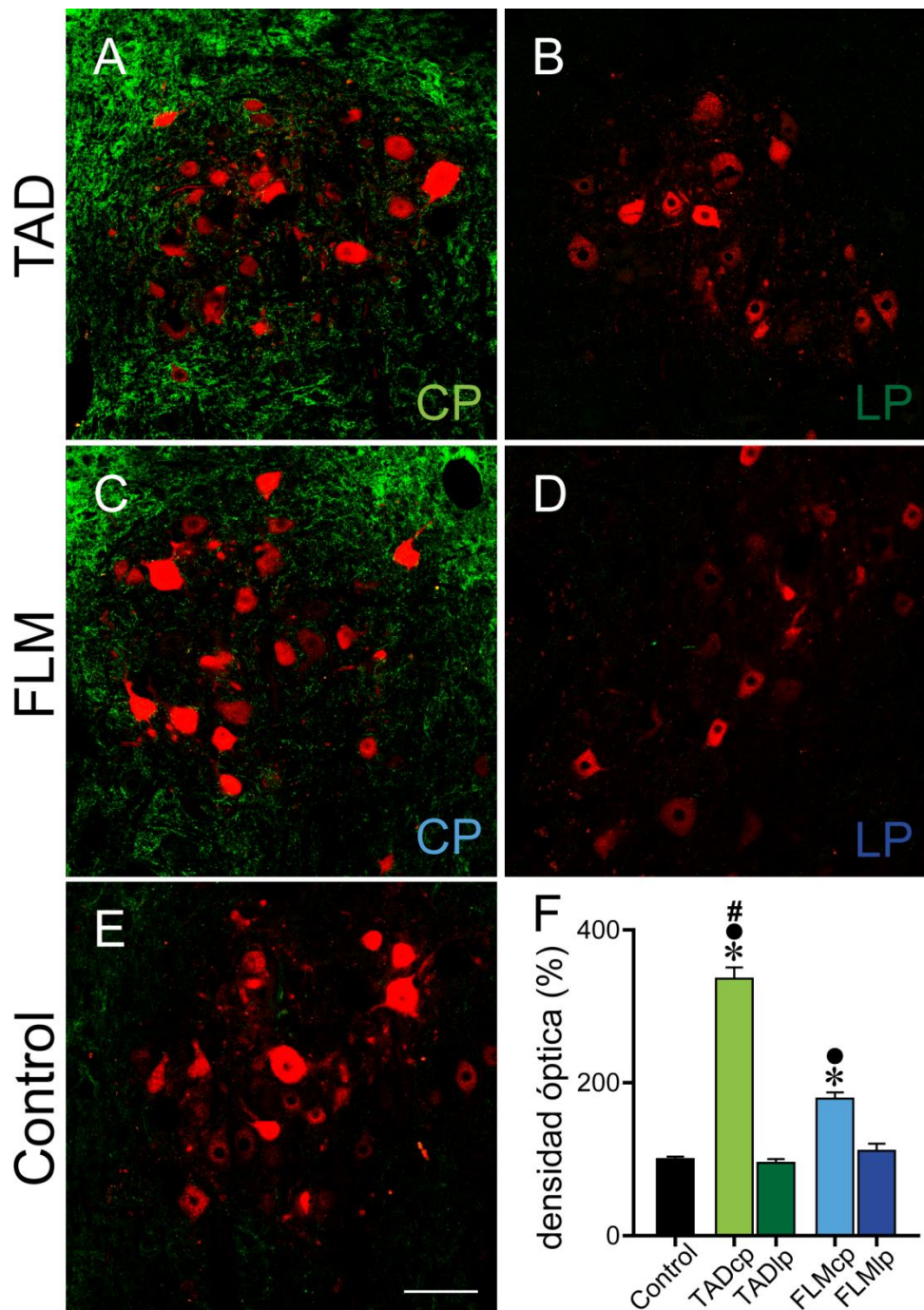


Figura 29. Cambios en la inmunorreactividad para GAP-43 en el neuropilo de las motoneuronas recto mediales tras la deaferentación selectiva en el gato. A-E: Imágenes de microscopía confocal de tinciones inmunocitoquímicas frente a GAP-43 (verde) de motoneuronas del recto medial de gatos con lesión en el TAD (A-B) o FLM (C-D), a corto (cp) y largo plazo (lp), respectivamente, y de un lado control (E). La población de motoneuronas del recto medial se identificó mediante rodamina (rojo). **F:** Histogramas comparando la densidad óptica (expresada en porcentaje con respecto al control) en la situación control y tras la sección del TAD o del FLM a corto y largo plazo. Los datos corresponden a los valores medios \pm EEM; $145 \leq n \leq 899$ medidas de densidad óptica. Nótese el aumento significativo de GAP-43 tras la deaferentación a corto plazo. Se indican las diferencias con respecto al grupo control (*), entre corto y largo plazo dentro de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#; $p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak). Barra de calibración: 100 μ m en E para A-E.

Este incremento a corto plazo de la densidad óptica fue estadísticamente mayor ($p < 0,001$) en los animales carentes de la entrada vestibular que en los que carecían de la proyección del NMOE, lo que indicaría que tras la eliminación de la aferencia vestibular, los axones provenientes del FLM aumentaron más su expresión de GAP-43 que en el experimento inverso.

El aumento en la proteína GAP-43, relacionada con el crecimiento axonal, en torno a la población de células recto medial, podría estar relacionado con la reorganización funcional de los tractos no lesionados, así como en la recuperación funcional de las propiedades de disparo de dichas neuronas, que es completa tras la lesión TAD, cuando hay un mayor incremento en la presencia de GAP-43 en los terminales remanentes, y parcial en el caso de la lesión del FLM, en la que la expresión de GAP-43 por parte de los axones intactos (provenientes del NVL) no aumenta tanto.

4.6. Cambios en la presencia de neurotrofinas en las motoneuronas del recto medial en respuesta a la sección unilateral del TAD o del FLM

El incremento en la presencia de GAP-43 en el neuropilo de las motoneuronas del recto medial deaferentadas, podría estar en relación con la posible formación de nuevas colaterales aferentes hacia dichas células a partir de axones presentes en el núcleo, que son las aferencias que se mantuvieron intactas. A continuación, se quiso conocer si existía una relación entre el aumento de GAP-43 y cambios en el contenido de neurotrofinas en las motoneuronas deaferentadas, debido a que estudios previos han demostrado que los factores tróficos estimulan la expresión de esta proteína (Geremia y col., 2010; Sanna y col., 2017). Para ello, se estudió la presencia de neurotrofinas en estas neuronas en control y tras la sección unilateral del TAD o del FLM a corto y largo plazo. Las motoneuronas del recto medial fueron inmunopositivas para las tres neurotrofinas, observándose un marcaje punteado por todo el citoplasma celular, sin destacarse el perímetro o compartimentos dentro del soma neuronal en todas las situaciones experimentales. A simple vista, en las imágenes tomadas en el microscopio, se observó un aumento en el contenido de las diferentes neurotrofinas en el soma de las motoneuronas del recto medial, 3 días tras la sección del TAD (Figura 30D-F) o del FLM (Figura 30J-L), con respecto a la situación control (Figura 30A-C) y con su mismo tipo de lesión pero a largo plazo (Figura 30G-I y Figura 30M-O, respectivamente).

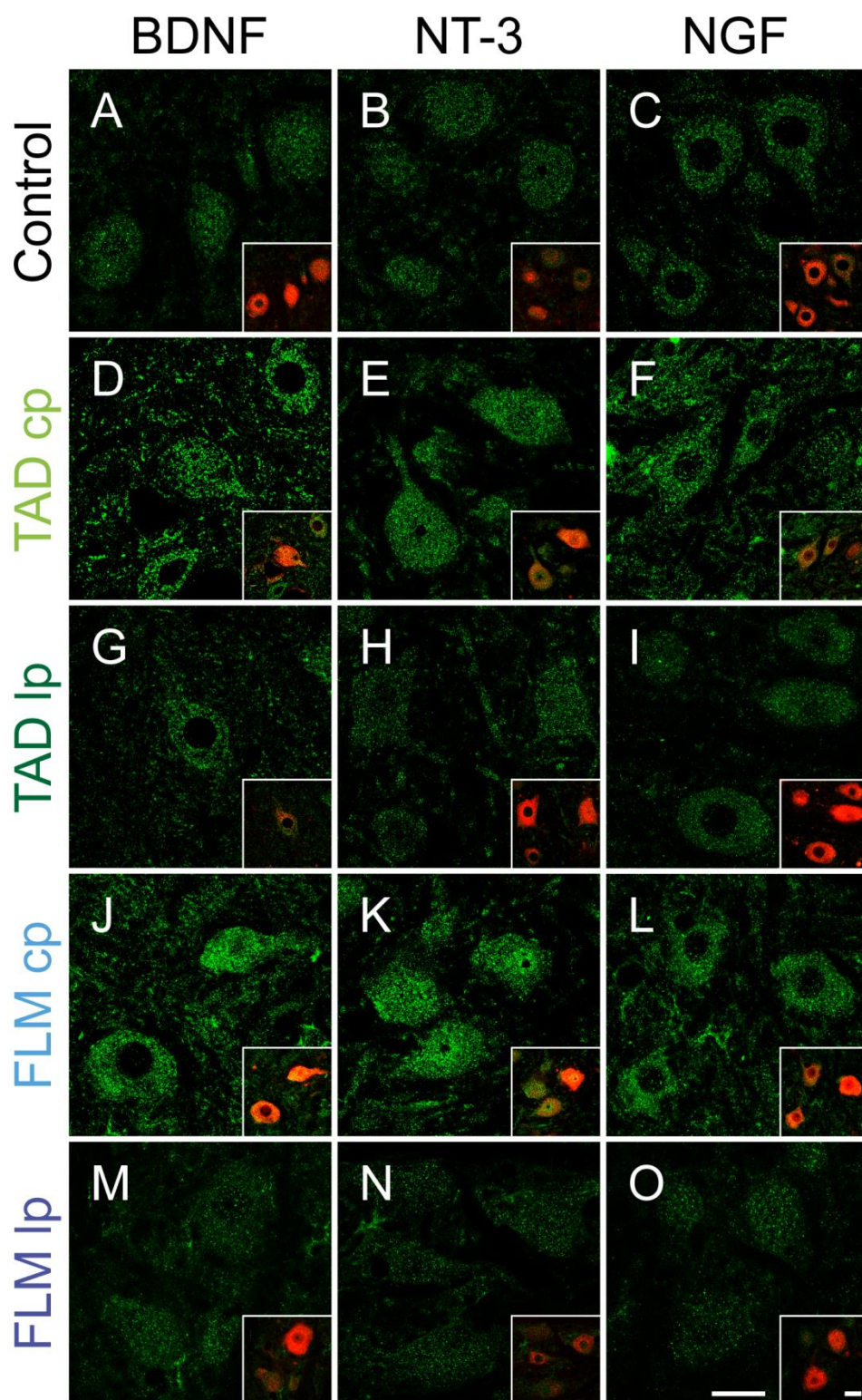


Figura 30. Neurotrofinas en las motoneuronas del recto medial tras la deaferentación selectiva en el gato. Imágenes de microscopía confocal de las motoneuronas del recto medial marcadas con un anticuerpo dirigido contra BDNF (primera columna), NT-3 (segunda columna) o NGF (tercera columna) en control (A-C), tras la sección del TAD o FLM a corto plazo (cp; D-F y J-L, respectivamente) o largo plazo (lp; G-I y M-O, respectivamente). Las motoneuronas fueron identificadas mediante inyecciones de rodamina en el músculo recto medial. Los insertos muestran el doble marcaje con rodamina y el anticuerpo dirigido contra la neurotrofina. Barra de calibración: 25 μ m en O para A-O. Barra de calibración del inserto: 30 μ m.

Posteriormente, se analizó la densidad óptica en el soma de las motoneuronas del recto medial en las diferentes situaciones, delimitando el perímetro somático y excluyendo el núcleo. Se cuantificó un aumento significativo ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples; Figura 31) de la densidad óptica a corto plazo en el soma de las motoneuronas recto mediales de los animales con el TAD o el FLM seccionado para las tres neurotrofinas, BDNF ($114,6 \pm 3,0\%$ y $110,1 \pm 2,0\%$, $n = 54$ y $n = 56$; Figura 31A, barra verde y azul claro, respectivamente), NT-3 ($121,2 \pm 4,9\%$ y $117,8 \pm 2,8\%$, $n = 30$ y $n = 60$; Figura 31B, barra verde y azul claro, respectivamente) y NGF ($118,8 \pm 4,1\%$ y $110,1 \pm 1,9\%$, $n = 49$ y $n = 59$; Figura 31C, barra verde y azul claro, respectivamente), con respecto a la situación control ($100,0 \pm 1,2\%$, $n = 161$ para BDNF; $100,0 \pm 1,4\%$, $n = 138$ para NT-3 y $100,0 \pm 1,3\%$, $n = 169$ para NGF; Figura 31A-C, respectivamente, barra negra). Sólo en el caso del NGF se detectaron diferencias entre ambos tipos de lesiones ($p = 0,013$) 3 días tras la misma. Por otro lado, no se observaron diferencias entre control y las lesiones a largo plazo del TAD ($103,0 \pm 2,2\%$, $n = 37$ para BDNF; $102,4 \pm 4,4\%$, $n = 24$ para NT-3 y $102,3 \pm 3,6\%$, $n = 17$ para NGF) o del FLM ($93,6 \pm 3,2\%$, $n = 22$ para BDNF; $105,2 \pm 4,8\%$, $n = 29$ para NT-3 y $99,4 \pm 2,7\%$, $n = 40$ para NGF) en el porcentaje de densidad óptica para ninguna de las tres neurotrofinas. En cambio, sí se vieron diferencias entre corto y largo plazo para las secciones del TAD o del FLM, con los tres factores neurotróficos ($p < 0,001$ para BDNF y NT-3; $p = 0,001$ para NGF y $p < 0,001$ para BDNF; $p = 0,004$ para NT-3 y NGF, respectivamente).

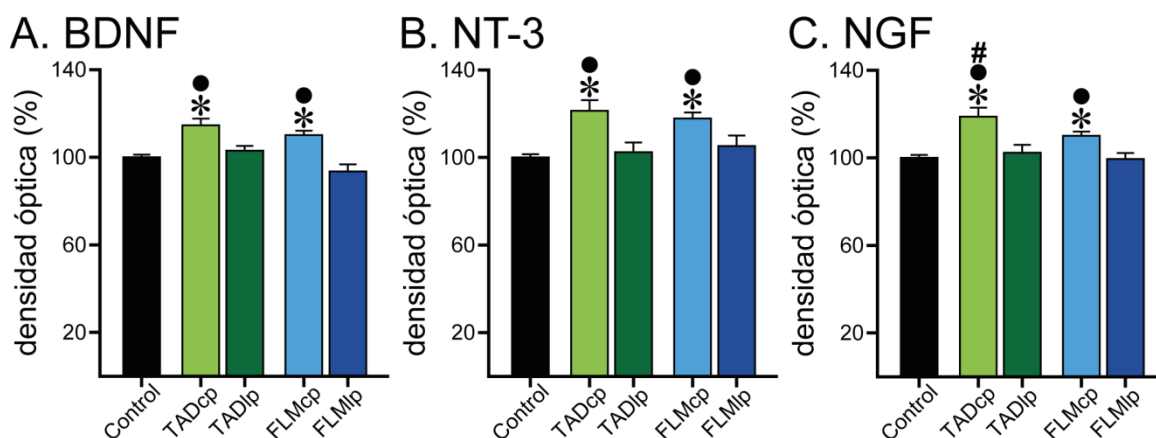


Figura 31. Cuantificación de la presencia de neurotrofinas en las motoneuronas del recto medial tras la deafferentación selectiva. A-C: Diagramas de barras ilustrando la densidad óptica en el soma de las motoneuronas del recto medial (expresada en porcentajes relativos al control) de BDNF (A), NT-3 (B) y NGF (C) en control y tras la sección unilateral a corto (cp) y largo plazo (lp) del TAD (barras verdes) o del FLM (barras azules). Se muestran los valores medios \pm EEM; $22 \leq n \leq 161$ células para BDNF; $24 \leq n \leq 138$ células para NT-3 y $17 \leq n \leq 169$ células para NGF. Se señalan las diferencias significativas respecto al grupo control (*), entre corto y largo plazo dentro de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#). Nótese el aumento significativo de marcaje a corto plazo con respecto a control y a largo plazo en ambas lesiones ($p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak).

4.7. Evolución temporal de los cambios sinaptológicos tras la deaferentación selectiva de las motoneuronas del recto medial

Para estudiar el curso temporal de la degeneración de los botones sinápticos presentes en el neuropilo y alrededor de los somas de las motoneuronas de la subdivisión del recto medial, se inició un segundo estudio morfológico para dilucidar los cambios en la sinaptología aferente 24, 48 y 96 horas tras la deaferentación selectiva. Este nuevo estudio se realizó mediante microscopia confocal en ratas adultas.

Previamente, se demostró mediante microscopía óptica la lesión unilateral del TAD o del FLM (Figura 32). Así, y al igual que en el gato, no se observaron axones inmunopositivos para calretinina en estos tractos, tras la sección del TAD o del FLM (Figura 32A y B, respectivamente, asteriscos). Además, la zona lesionada mostró el fenotipo propio tras una lesión, con una llamativa degradación del tejido lesionado que estaba ausente en el lado control. En la figura 32C y D se puede observar la cicatriz en el tejido tras la sección unilateral del TAD (delimitado por flechas) o del FLM (señalado por la flecha) mediante tinción de Nissl, respectivamente.

Mediante una tinción inmunohistoquímica contra calretinina, se estudiaron los cambios en la inervación a las motoneuronas del recto medial, en el lado control (Figura 33G) y 24 (Figura 33A y D), 48 (Figura 33B y E) y 96 horas (Figura 33C y F) tras la sección del TAD o del FLM, respectivamente. La tinción frente a calretinina dio como resultado un punteado localizado por todo el neuropilo de las motoneuronas del recto medial. La población de motoneuronas del recto medial fue identificada mediante la rodamina inyectada bilateralmente en los músculos rectos mediales. Cualitativamente, se distingue una mayor inmunorreactividad para calretinina en el lado control que en aquellos que sufrieron alguna de las posibles lesiones.

Los análisis de las imágenes obtenidas (Figura 33H) mostraron una disminución progresiva de la densidad óptica para calretinina en el neuropilo circundante a los somas de las motoneuronas del recto medial ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) 24, 48 y 96 horas tras la sección del FLM ($80,7 \pm 1,8\%$, $62,2 \pm 1,4\%$ y $59,8 \pm 1,6\%$, $n = 369$, $n = 304$ y $n = 400$ medidas, respectivamente; Figura 33H, barras azules), en comparación con la situación control ($100,0 \pm 4,2\%$, $n = 1820$; Figura 33H, barra negra). Además, se observó que al tiempo más corto analizado, 24 horas, presentó una densidad óptica significativamente mayor que el resto ($p < 0,001$), indicando así la degeneración progresiva de los procesos axonales positivos para calretinina.

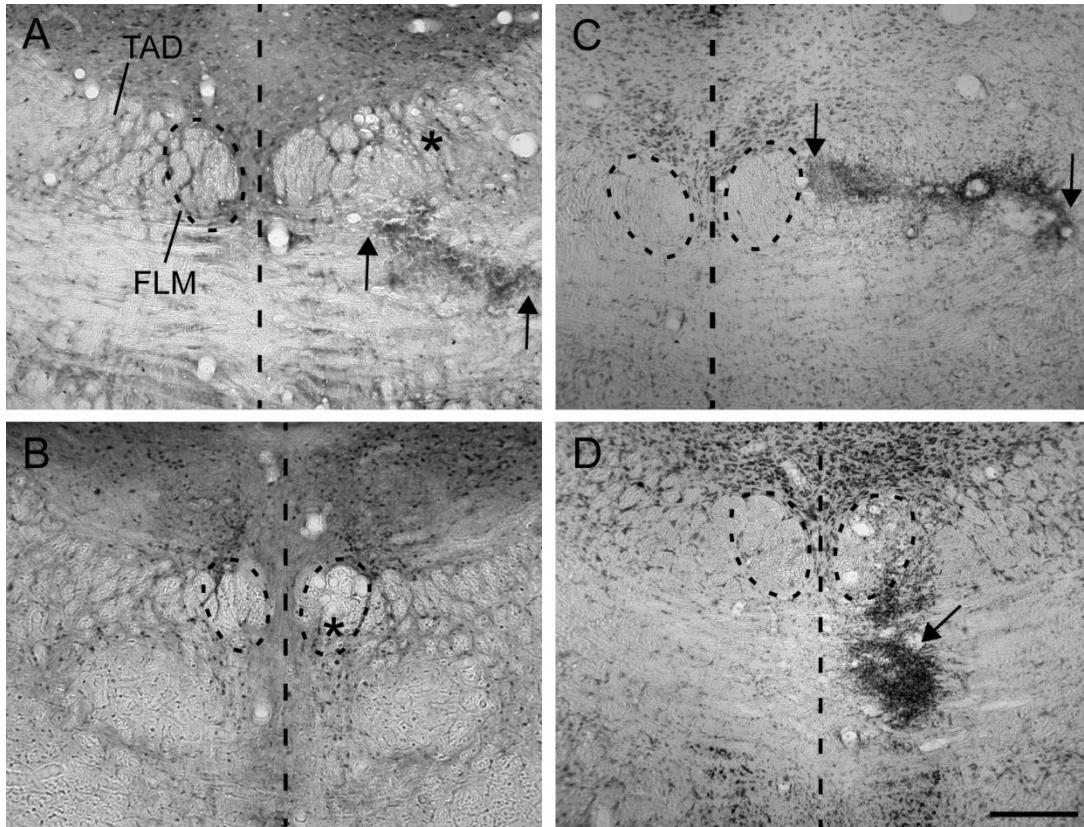


Figura 32. Demostración de la lesión del FLM y del TAD en la rata. **A, B:** Sección mesencefálica de un animal con el tracto ascendente de Deiters (TAD, **A**) o el fascículo longitudinal medial (FLM, **B**) seccionado. Nótese la ausencia de axones positivos para calretinina en dicho tracto así como la aparición de la cicatriz glial en el tejido señalado por los asteriscos. **C, D:** Demostración mediante tinción de Nissl de la lesión unilateral del TAD (**C**) o del FLM (**D**), señalando con flechas el tejido cicatricial producido por la cuchilla. En todas las imágenes los FLM están contorneados por círculos discontinuos. Las líneas verticales discontinuas señalan la línea media. Barra de calibración: 300 μ m.

Por otro lado, en los animales en los que se seccionó el TAD se observaron diferencias significativas en los tres grupos post-lesión con respecto al grupo control ($p < 0,001$). Así, se obtuvo una densidad óptica en el neuropilo de $80,0 \pm 3,2\%$, $64,6 \pm 4,2\%$ y $90,2 \pm 2,8\%$ a las 24, 48 y 96 horas post-lesión ($n = 180$, $n = 233$, $n = 325$, respectivamente; Figura 33H, barras verdes), con respecto a la densidad óptica durante la situación control. Además, la densidad óptica de calretinina 48 horas post-lesión fue significativamente menor ($p < 0,001$) que a 24 y 96 horas. Asimismo, también se encontraron diferencias entre 24 y 96 horas tras la axotomía ($p = 0,012$).

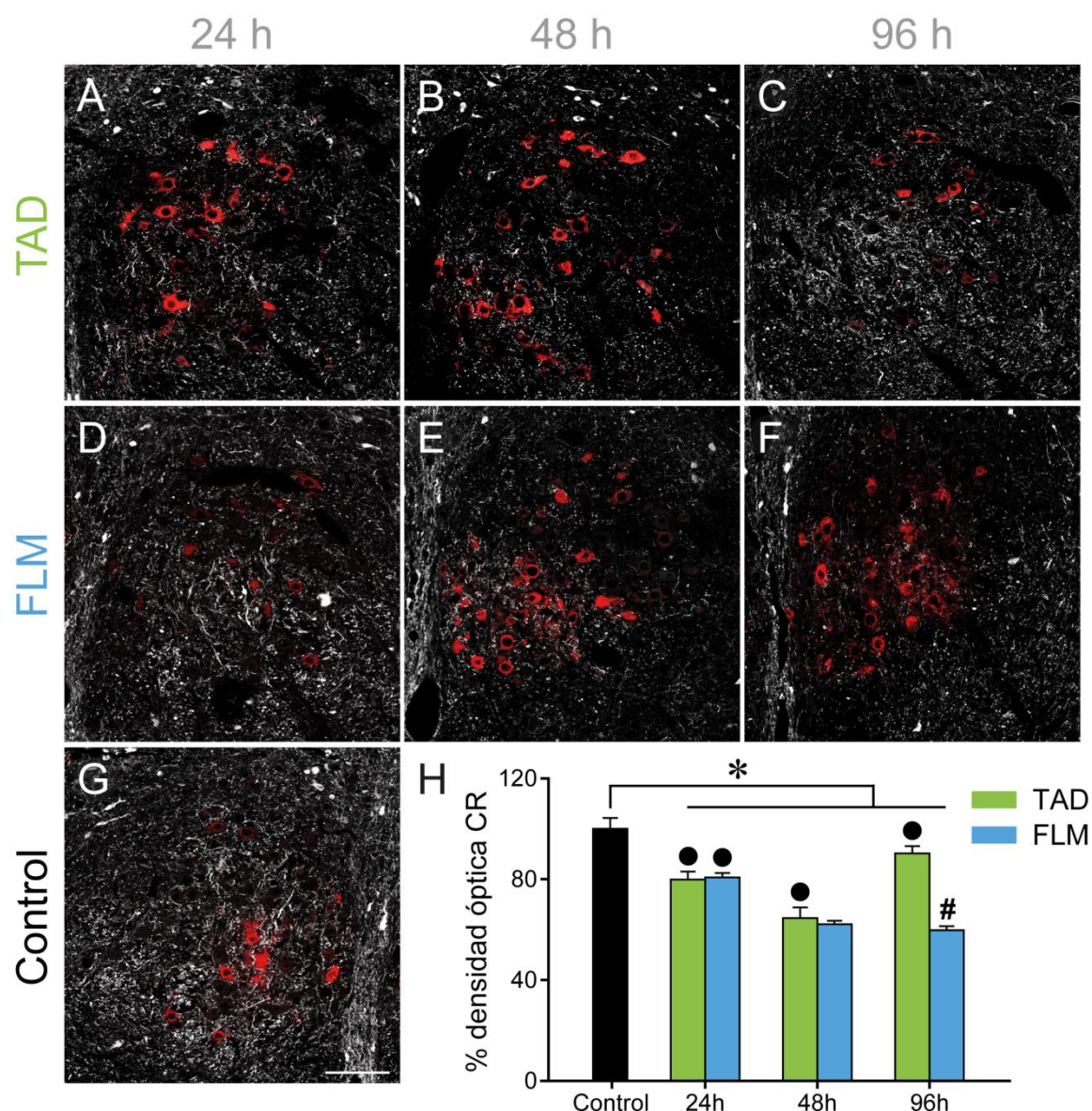


Figura 33. Curso temporal a corto plazo de los cambios en la cobertura sináptica en el neuropilo de las motoneuronas del recto medial deaferentadas. A-G: Fotomicrografías obtenidas por microscopía confocal de la subdivisión recto medial de la rata identificada mediante rodamina (rojo) y tras la inmunofluorescencia para calretinina (CR, blanco) en control (**G**) y 24, 48 o 96 horas tras la sección del TAD (**A-C**, respectivamente) o del FLM (**D-F**, respectivamente). Barra de calibración: 100 μ m. **H:** Histogramas comparando la densidad óptica de calretinina (expresada en porcentaje con respecto al control) en la condición control (barra negra) y 24, 48 o 96 horas tras la axotomía del TAD (barras verdes) o del FLM (barras azules). Los valores mostrados corresponden a la media \pm EEM; $180 \leq n \leq 1820$ medidas de densidad óptica. Se señalan las diferencias significativas respecto al grupo control (*), entre puntos de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#; $p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak).

Entre ambos tipos de lesiones solo se observaron diferencias significativas a 96 horas post-lesión ($p < 0,001$). Estos resultados indicaron que tras la sección unilateral del TAD, se produjo una bajada progresiva en la inmunorreactividad frente a calretinina hasta 48 horas post-deaferentación, para más tarde aumentar a 96 horas tras la lesión, siendo significativamente mayor que el resto de grupos post-lesión. Este resultado indicaría un posible mecanismo compensatorio de crecimiento y ramificación axonal, desencadenado en respuesta a la deaferentación.

Asimismo, y al igual que se hiciera en el gato, se estudió, también mediante microscopía confocal, la distribución y cantidad de botones positivos para calretinina alrededor del cuerpo celular de las motoneuronas del recto medial control (Figura 34G y H), y tras la sección unilateral del TAD o del FLM a 24, 48 y 96 horas post-lesión (Figura 34A y B; Figura 34C y D; Figura 34E y F, respectivamente).

En primer lugar se estudió la evolución temporal de la cobertura sináptica sobre la superficie somática de las motoneuronas. La cobertura se midió como porcentaje del perímetro somático ocupado por los botones marcados con calretinina. En control, las motoneuronas del recto medial presentaron un $19,6 \pm 0,5\%$ del perímetro somático cubierto por terminaciones inmunopositivas para calretinina ($n = 307$ células; Figura 35A, barra negra). La sección del TAD (Figura 35A, barras verdes) o del FLM (Figura 35A, barras azules) redujo significativamente el porcentaje de perímetro cubierto por axones terminales inmunorreactivos para calretinina en todos los tiempos post-lesión medidos ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples), salvo 24 horas tras la lesión del FLM ($p = 0,631$). Sin embargo, los resultados obtenidos para los dos tipos de lesiones fueron diferentes. En los animales con el TAD seccionado, se observó una caída progresiva hasta 48 horas en el perímetro somático cubierto por botones calretinina ($11,0 \pm 0,5\%$ y $6,2 \pm 0,4\%$, $n = 95$ y $n = 80$, para 24 y 48 horas, respectivamente), que se recuperó a 96 horas post-lesión ($13,2 \pm 0,8\%$, $n = 78$), siendo diferente de los grupos experimentales a tiempos más cortos ($p = 0,049$ y $p < 0,001$ para 24 y 48 horas, respectivamente). Por el contrario, en los animales carentes de la proyección del NMOE, disminuyó la cobertura de calretinina en las motoneuronas con el tiempo, que fue máxima a 96 horas post-lesión ($7,0 \pm 0,3\%$, $n = 99$). Además, en estos animales se cuantificaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los diferentes grupos post-lesión.

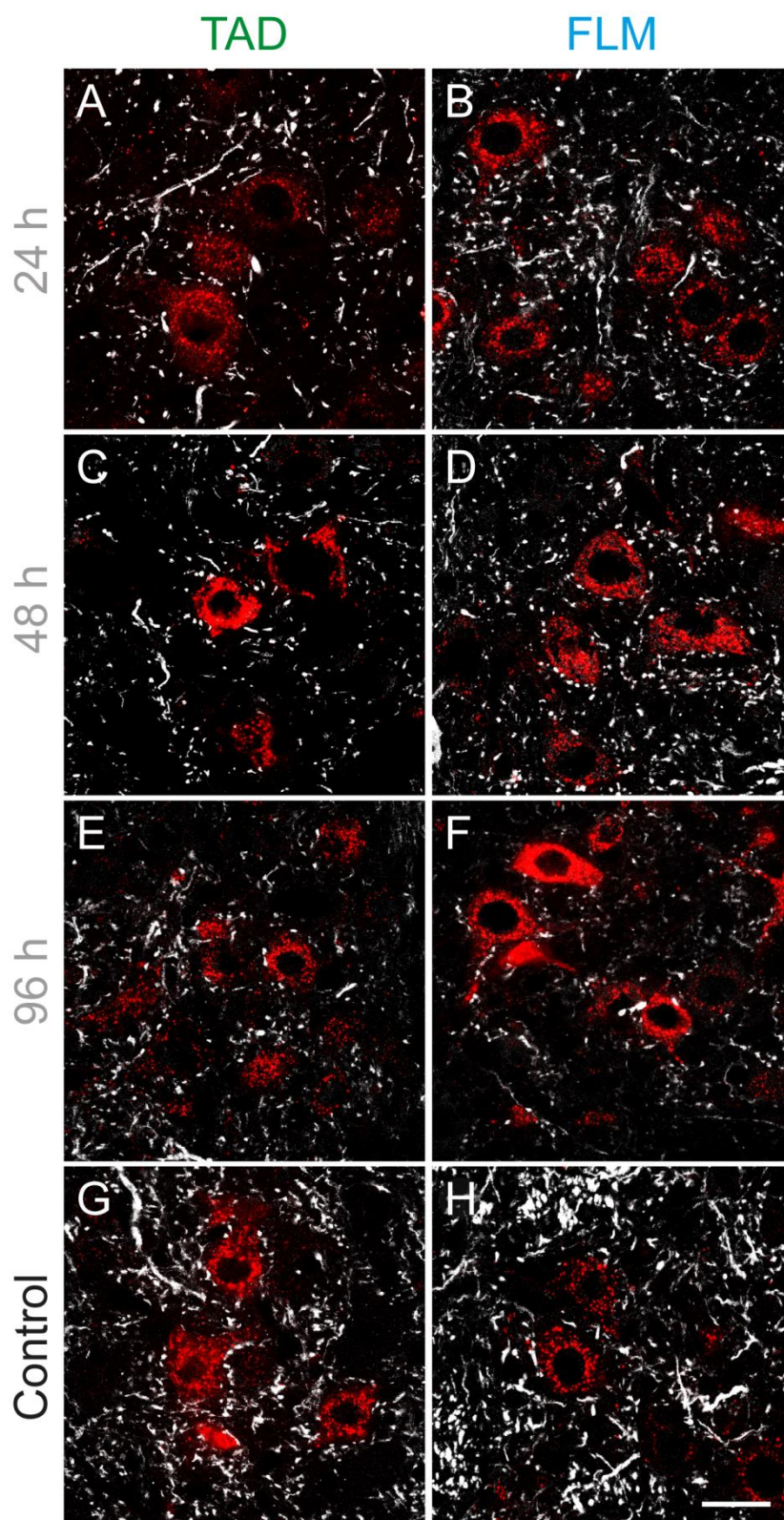


Figura 34. Cambios en la cobertura sináptica somática tras la deaferentación selectiva de las motoneuronas del recto medial de la rata. Imágenes de microscopía confocal de las neuronas motoras del recto medial, identificadas mediante rodamina (rojo), y botones sinápticos inmunorreactivos a calretinina (blanco) en control (G, H) y 24 (A, B) 48 (C, D) o 96 horas (E, F) tras la sección unilateral del TAD o del FLM, respectivamente. Barra de calibración: 25 μ m.

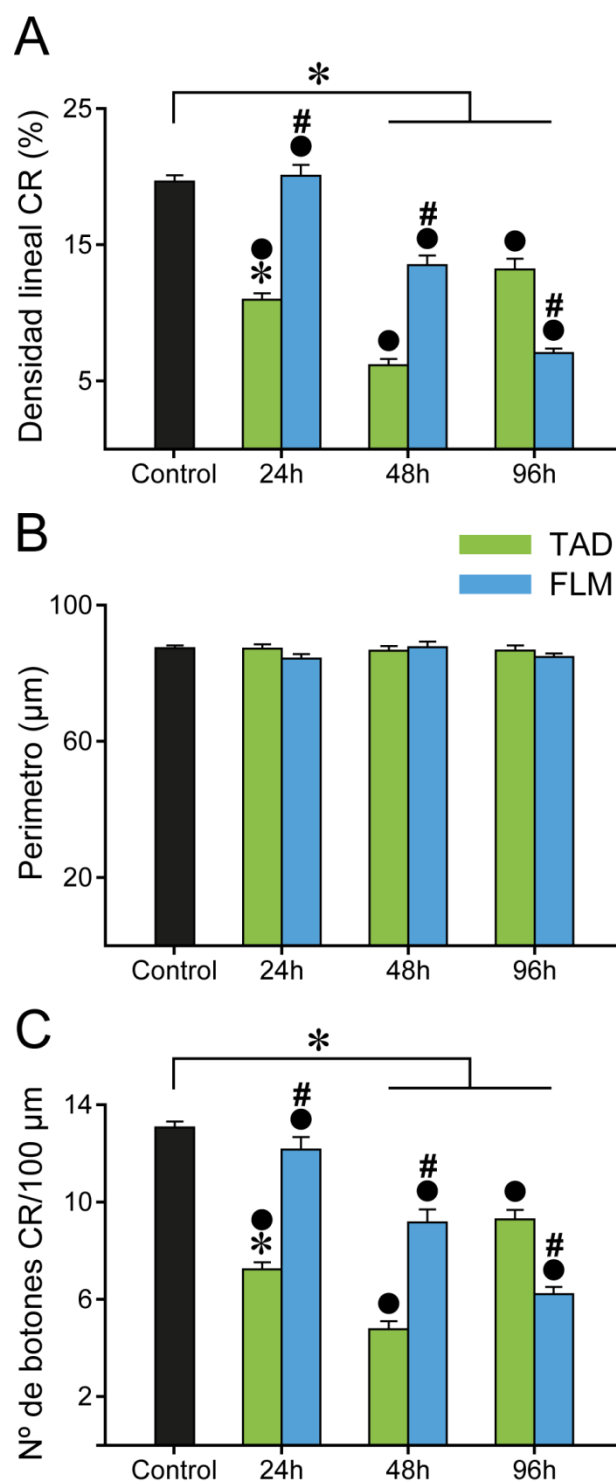


Figura 35. Curso temporal de los cambios en la cobertura sináptica somática en las motoneuronas del recto medial de la rata tras la deaferentación selectiva. A: Diagrama de barras donde se muestra el porcentaje de perímetro somático de neuronas del recto medial cubierto por botones inmunorreactivos para calretinina (CR) en control (barra negra) y 24, 48 o 96 horas tras la sección del TAD (barras verdes) o del FLM (barras azules). Los datos se presentan como los valores medios \pm EEM; $78 \leq n \leq 307$ células. Se señalan las diferencias significativas respecto al grupo control (*), entre puntos de una misma lesión (•) y entre ambas lesiones en un mismo punto temporal (#; $p < 0,05$; ANOVA de dos factores, test Holm-Sidak). **B y C:** Diagramas de barras como en **A** pero representando el perímetro somático (**B**) y el número de botones calretinina alrededor del soma (**C**).

Para comprobar si los cambios en la cobertura sináptica guardaban alguna relación con variaciones en el tamaño somático de las motoneuronas del recto medial, se midió el perímetro somático de cada célula en los diferentes grupos experimentales. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados (Figura 35B).

A continuación, se quiso demostrar si la reducción en la cobertura sináptica en ambos tipos de lesiones estaba relacionada con un decremento en el número de botones sinápticos inmunopositivos frente a calretinina. Se observó, tanto para la lesión en el TAD (Figura 35C, barras verdes) como en el FLM (Figura 35C, barras azules) una disminución significativa en el número de botones alrededor de los somas en todos los tiempos post-lesión ($p < 0,001$, ANOVA de dos factores, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples), con respecto de la situación control ($13,0 \pm 0,3$, $n = 307$; Figura 35C, barra negra). De nuevo, ambas lesiones produjeron una respuesta diferente; los animales con sección en el FLM mostraron una reducción progresiva en el número de botones ($10,2 \pm 0,5$, $8,0 \pm 0,5$ y $5,2 \pm 0,3$, $n = 95$, $n = 71$ y $n = 99$ botones para 24, 48 y 96 horas post-lesión, respectivamente). Por otra parte, los animales carentes de la proyección vestibular mostraron una reducción gradual en el tiempo hasta 48 horas post-lesión ($4,2 \pm 0,3$, $n = 80$), incrementando el número de botones alrededor de los somas de las motoneuronas a 96 horas tras la deaferentación ($8,1 \pm 0,4$, $n = 78$). En ambas deaferentaciones se observaron diferencias entre todos los tiempos post-lesión analizados, así como entre lesiones en un mismo punto temporal ($p < 0,001$).

4.8. Distribución de neurotrofinas en el sistema oculomotor de la rata

En el presente estudio hemos visto que tras la deaferentación selectiva de las motoneuronas del recto medial se produce un aumento en la presencia de los factores neurotróficos BDNF, NT-3 y NGF a corto plazo tras la lesión, pudiéndose relacionar con los procesos plásticos que ocurren tras la misma. Además, las motoneuronas oculomotoras presentan ciertas propiedades intrínsecas que las hacen más resistentes a la neurodegeneración durante la esclerosis lateral amiotrófica (ELA; Haenggeli y Kato, 2002; Reiner y col., 1995). De esta manera, en el presente trabajo se ha pretendido caracterizar el patrón de distribución de neurotrofinas en los núcleos del sistema oculomotor de la rata, y compararla con otros núcleos motores del tronco del encéfalo vulnerables a la degeneración durante la ELA, el núcleo facial y el núcleo hipogloso.

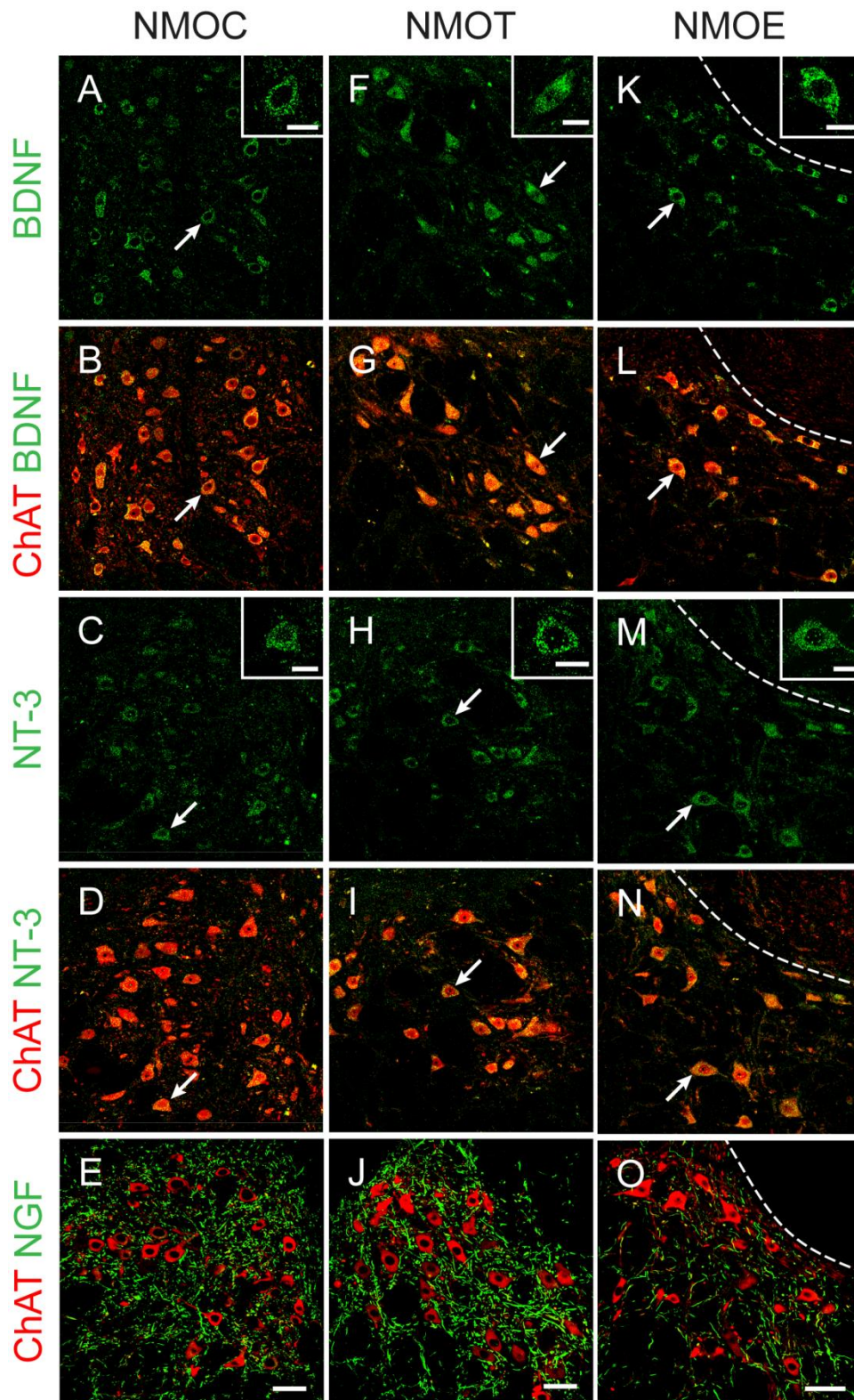


Figura 36. Neurotrofinas en el sistema oculomotor de la rata. Imágenes de microscopía confocal del NMOC (A-E), NMOT (F-J) y NMOE (K-O) marcadas con un anticuerpo dirigido contra BDNF (primera y segunda fila), NT-3 (tercera y cuarta fila) o NGF (quinta fila) en control. Las motoneuronas fueron identificadas mediante una inmunohistoquímica frente a la proteína ChAT (rojo). Los insertos muestran el marcaje en una motoneurona para cada neurotrofina. Las flechas señalan las motoneuronas ilustradas en los insertos. Barra de calibración: 100 μ m (en E para A-E, en J para F-J y en O para K-O). Barra de calibración de los insertos: 25 μ m.

4.8.1. Patrón de distribución de neurotrofinas en las motoneuronas del sistema oculomotor de la rata adulta

La inmunohistoquímica frente a ChAT permitió localizar los núcleos oculomotores en el tronco del encéfalo de ratas e identificar a las motoneuronas presentes en ellos (Figura 36). En el caso del NMOC (Figura 36A-E) y del NMOE (Figura 36K-O) se pudo diferenciar la población de neuronas internucleares de la población de motoneuronas, puesto que exclusivamente las motoneuronas expresan la proteína ChAT. La tinción frente a las neurotrofinas BDNF (Figura 36A, F y K) y NT-3 (Figura 36C, H y M) dio como resultado un punteado localizado por todo el citoplasma de las motoneuronas de los núcleos oculomotores, sin destacarse el perímetro celular ni compartimentos dentro del soma neuronal (Figura 36, flechas). En el caso de la inmunohistoquímica frente a NGF, el marcaje en el soma celular fue débil o inexistente (Figura 36E, J y O), aunque se observó que su distribución se concentraba en los procesos dendríticos de las motoneuronas, distribuyéndose por el neuropilo de todos los núcleos oculomotores (Figura 38A-C).

4.8.2. Patrón de distribución de neurotrofinas en motoneuronas de otros núcleos del tronco del encéfalo

A continuación, se examinó la presencia de neurotrofinas en otros núcleos motores del tronco del encéfalo que son susceptibles a la neurodegeneración durante la ELA. Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpos frente a BDNF, NT-3 y NGF en cortes encefálicos a nivel de los núcleos facial e hipogloso. Nuevamente, distinguimos que el marcaje de las motoneuronas que fueron positivas para BDNF (Figura 37A y F) y NT-3 (Figura 37C y H) se concentró en el soma de las mismas. Una alta proporción de las motoneuronas faciales fueron inmunopositivas para BDNF (Figura 37A y B). Sin embargo, el número de estas neuronas que presentaron inmunorreactividad frente a NT-3 fue muy reducido (Figura 37C y D). Por otro lado, muy escasas células motoras del hipogloso fueron positivas para BDNF (Figura 37F y G) o NT-3 (Figura 37H e I). De nuevo, observamos procesos dendríticos inmunopositivos frente a NGF en motoneuronas de los núcleos facial (Figura 38D-F) e hipogloso (Figura 38G-I), sin encontrarse neuronas motoras con somas teñidos en ninguno de los dos núcleos (Figura 37E y J).

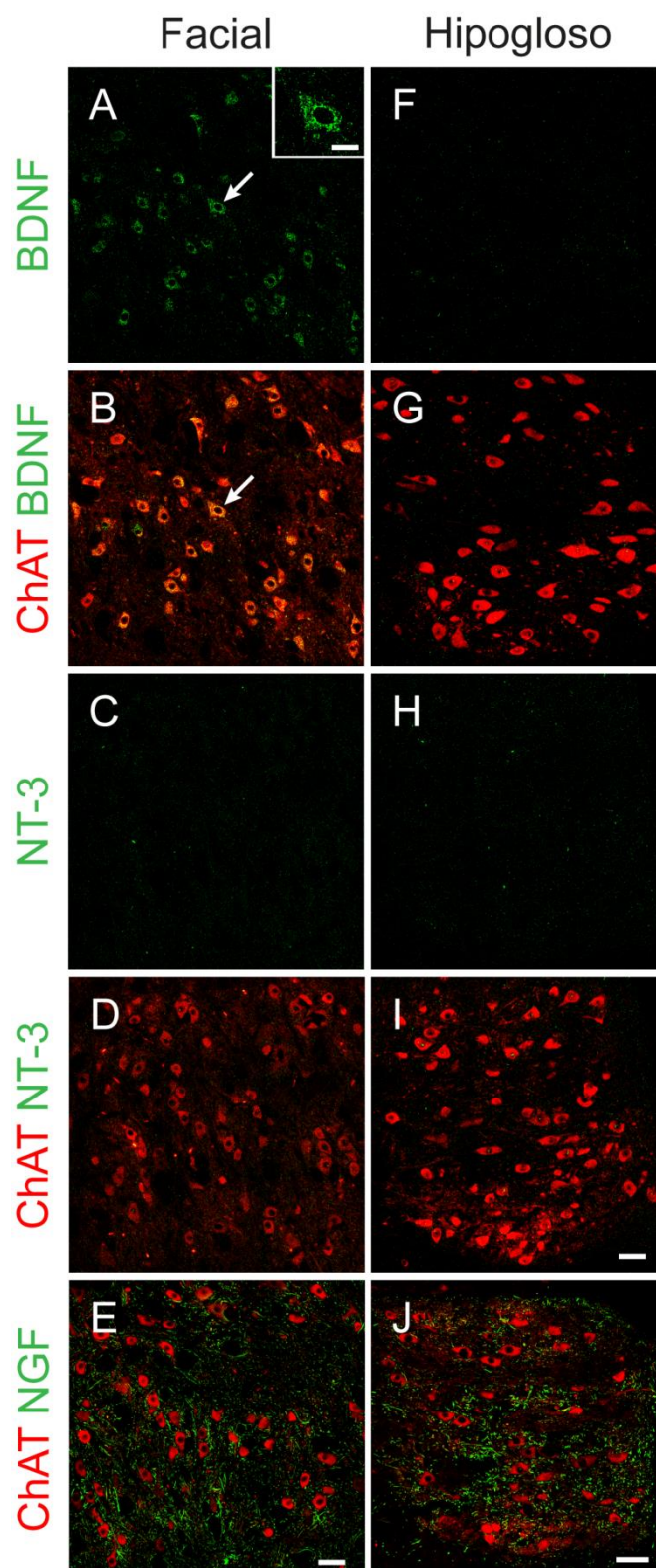


Figura 37. Patrón de distribución de neurotrofinas en los núcleos facial e hipogloso de la rata. Imágenes de microscopía confocal del núcleo facial (A-E) e hipogloso (F-J) marcadas con un anticuerpo dirigido contra BDNF (primera y segunda fila), NT-3 (tercera y cuarta fila) o NGF (quinta fila) en control. Las motoneuronas fueron identificadas mediante una inmunohistoquímica frente a ChAT (rojo). El inserto muestra el marcaje de una motoneurona para BDNF en el núcleo facial. La flecha señala la motoneurona ilustrada en el inserto. Barra de calibración: 100 μ m (en E para A-E y en J para F-J). Barra de calibración del inserto: 25 μ m

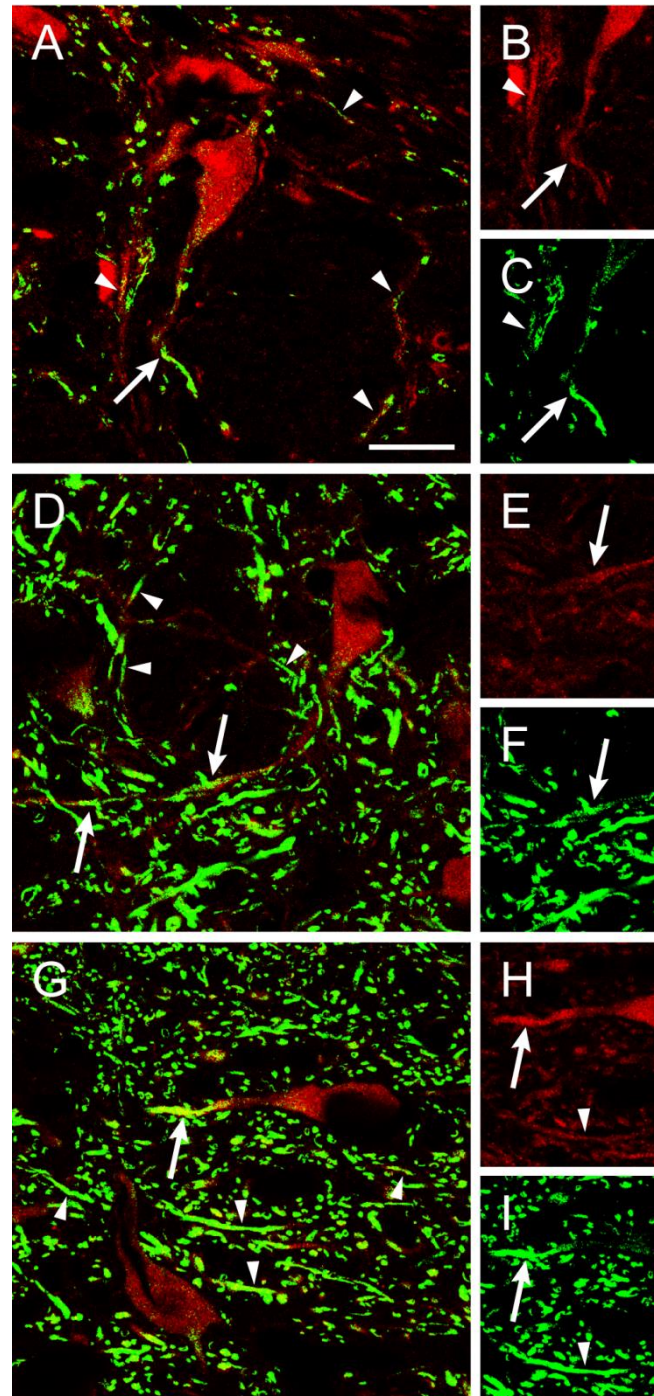


Figura 38. Presencia de la neurotrofina NGF en los procesos dendríticos de las motoneuronas del tronco del encéfalo de la rata. Fotomicrografías obtenidas por microscopía confocal del NMOE (A-C), núcleo facial (D-F) e hipogloso (G-I) mostrando procesos dendríticos de neuronas motoras colocalizando con el factor NGF. Las flechas señalan procesos dendríticos unidos al soma de las motoneuronas e inmunopositivos para NGF. Las puntas de flecha apuntan procesos en el neuropilo inmunorreactivos a NGF. La columna derecha muestra por separado el marcaje para ChAT (rojo) y el NGF (verde) para una misma dendrita. Barra de calibración: 25 μ m.

4.8.3. Análisis cuantitativo de la densidad óptica de neurotrofinas

El porcentaje de células inmunopositivas para BDNF y NT-3 con respecto al número total de motoneuronas fue similar en los tres núcleos oculomotores estudiados (Figura 39A y B, barras azules). En el NMOC, el $95,9 \pm 2,2\%$ ($n = 381$ células) y el $89,4 \pm 5,3\%$ ($n = 468$) de las motoneuronas fueron positivas frente a los factores neurotróficos BDNF y NT-3, respectivamente. En el NMOT, se observaron células positivas para las neurotrofinas BDNF y NT-3 con una incidencia media de dichos factores tróficos en sus motoneuronas del $97,8 \pm 1,1\%$ y del $95,8 \pm 0,4\%$, respectivamente. En el caso del NMOE, se comprobó que el 100% de las motoneuronas eran positivas para la neurotrofina BDNF, mientras que el $94,8 \pm 2,9\%$ lo eran para la del factor neurotrófico NT-3 (Figura 39A y B, barras azules). No se midieron diferencias significativas en el porcentaje de motoneuronas inmunopositivas para BDNF o NT-3 dentro de un mismo núcleo (*t*-test) o entre los tres núcleos oculomotores (ANOVA de un factor, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples).

Por otro lado el análisis cuantitativo mostró diferencias entre los tres núcleos oculomotores y los núcleos facial e hipogloso. Aunque un alto porcentaje de motoneuronas faciales fueron positivas para BDNF ($87,6 \pm 6,5\%$, $n = 520$; Figura 39A, barra naranja), solo un $4,8 \pm 2,1\%$ ($n = 443$) del total de las motoneuronas del hipogloso lo fueron (Figura 39A, barra burdeos), siendo estadísticamente diferente del resto de núcleos estudiados ($p < 0,001$, ANOVA de un factor, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples). Para el factor NT-3, el porcentaje de motoneuronas inmunorreactivas en los núcleos facial ($3,2 \pm 1,4\%$, $n = 488$; Figura 39B, barra naranja) e hipogloso ($0,2 \pm 0,2\%$, $n = 437$; Figura 39B, barra burdeos) fue estadísticamente menor del valor obtenido para los núcleos del sistema oculomotor ($p < 0,001$).

A continuación, se midió la densidad óptica de NGF en el neuropilo de todos los núcleos troncoencefálicos estudiados. La densidad óptica en los núcleos del sistema oculomotor ($21,4 \pm 0,4\%$, $20,0 \pm 0,4\%$ y $20,4 \pm 0,5\%$, $n = 252$, $n = 303$ y $n = 210$ medidas para NMOC, NMOT y NMOE, respectivamente; Figura 39C, barras azules) fue estadísticamente mayor ($p < 0,001$, ANOVA de un factor, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) que la obtenida para los núcleos facial ($15,7 \pm 0,4\%$, $n = 433$; Figura 39C, barra naranja) e hipogloso ($17,6 \pm 0,4\%$, $n = 427$; Figura 39C, barra burdeos).

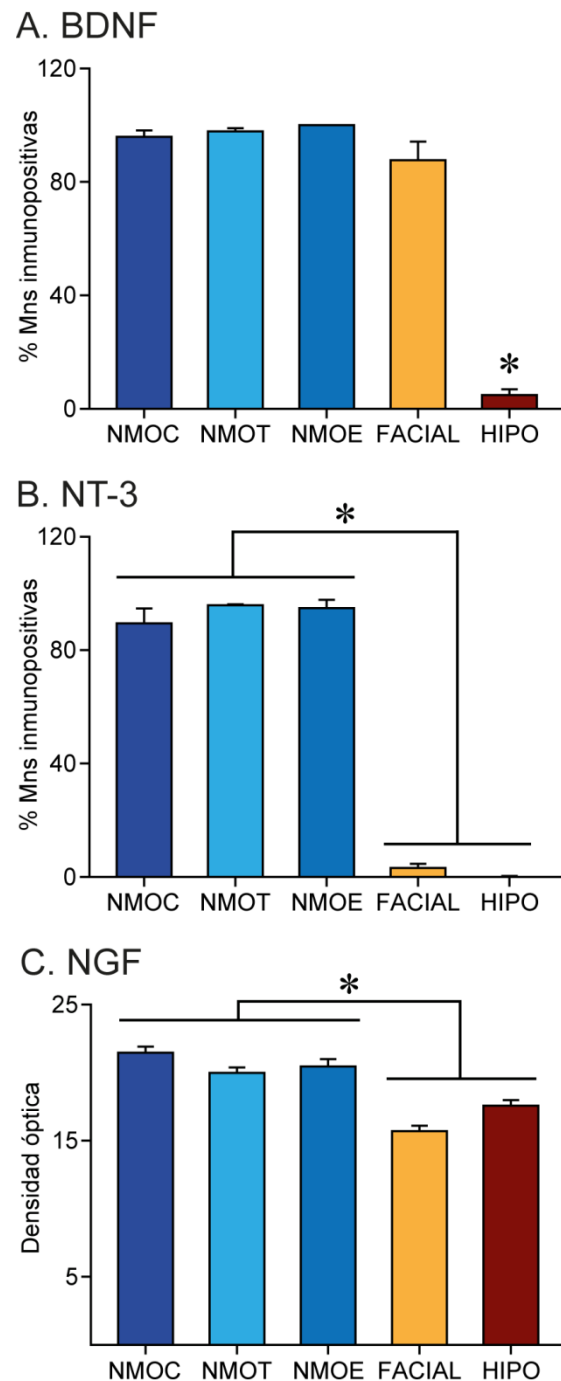


Figura 39. La cuantificación del porcentaje de motoneuronas inmunopositivas para neurotrofinas fue mayor en el sistema oculomotor que en los núcleos facial e hipogloso. A, B: Histogramas que comparan la proporción de motoneuronas (Mns) inmunorreactivas para BDNF (A) y NT-3 (B) en los núcleos oculomotores (NMOC, NMOT y NMOE, barras azules) y en los núcleos facial (barras naranjas) e hipogloso (HIPO, barras burdeos). Los datos se presentan como los valores medios \pm EEM; $84 \leq n \leq 520$ células. **C:** Histogramas como en A y B pero representando la densidad óptica para NGF en el neuropilo de los núcleos motores troncoencefálicos analizados. Los datos se presentan como los valores medios \pm EEM; $210 \leq n \leq 433$ medidas de densidad óptica. Los asteriscos señalan diferencias significativas entre los grupos señalados ($p < 0,05$; ANOVA de un factor, test Holm-Sidak).

4.8.4. Presencia de neurotrofinas en los músculos craneales

Mediante Western Blot se estudió la presencia de los factores neurotróficos BDNF, NT-3 y NGF en la musculatura extraocular, así como en el músculo buccinador y la lengua, inervados por las motoneuronas de los núcleos facial e hipogloso, respectivamente. Los tres pares de músculos extraoculares fueron procesados juntos, en la misma muestra. Las neurotrofinas analizadas estuvieron presentes en todos los músculos estudiados. Así, obtuvimos una banda de peso molecular alrededor de los 13 kDa para las tres neurotrofinas, correspondiente con las formas maduras, además de una serie de bandas de peso molecular mayor relacionadas con las formas precursoras. De todas ellas, nos centramos en las bandas de 37, 35 y 27 kDa para BDNF, NT-3 y NGF, respectivamente, correspondientes a las isoformas pro-neurotrofinas (Figura 40).

La cantidad de proteína total de BDNF, NT-3 y NGF fue cuantificada mediante análisis de densidad óptica, y los valores obtenidos fueron normalizados a partir de los datos medidos para la musculatura extraocular. Así, la musculatura extraocular presentó una cantidad mayor ($p < 0,001$, ANOVA de un factor, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) de proteína madura que el músculo buccinador y la lengua para las neurotrofinas BDNF (100%, $38,3 \pm 7,5\%$, $30,9 \pm 9,0\%$; Figura 41A), NT-3 (100%, $45,7 \pm 6,5\%$, $29,1 \pm 5,3\%$; Figura 41B) y NGF (100%, $39,4 \pm 7,4\%$, $51,4 \pm 12,5\%$; Figura 41C), respectivamente. La cantidad de proteína madura en el músculo buccinador y la lengua solo fue diferente para el NT-3 ($p = 0,023$). En relación a la isoforma pro-neurotrofina, la cantidad total varió dependiendo del factor neurotrófico. No se detectaron diferencias significativas entre los músculos estudiados, para las neurotrofinas BDNF (100%, $157,3 \pm 29,7\%$, $228,0 \pm 86,0\%$ para la musculatura extraocular, buccinador y lengua, respectivamente, $p = 0,245$; Figura 41D) y NGF (100%, $58,7 \pm 20,5\%$, $70,8 \pm 19,6\%$ para la musculatura extraocular, buccinador y lengua, respectivamente, $p = 0,177$; Figura 41F). Solo la isoforma pro-NT-3 fue estadísticamente más elevada en la musculatura extraocular que en el buccinador y la lengua (100%, $64,8 \pm 7,5\%$, $51,5 \pm 7,6\%$, respectivamente, $p < 0,001$, ANOVA de un factor, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples; Figura 41E). Finalmente, medimos la ratio entre la cantidad de proteína madura y la isoforma pro-neurotrofina, donde ratios mayores de 1 determinaron una cantidad más elevada de formas maduras que de isoformas inmaduras. Así, para la neurotrofina BDNF medimos una cantidad más elevada de la forma pro-neurotrofina que de la forma madura en los todos los músculos analizados (Figura 41G), mientras que la ratio fue estadísticamente menor ($p < 0,001$, ANOVA de un factor, Test Holm-Sidak para comparaciones múltiples) en el buccinador ($0,2 \pm 0,04$) y la lengua ($0,1 \pm 0,03$) que en la musculatura extraocular ($0,7 \pm 0,1$). Para los factores NT-3 ($1,3 \pm 0,3$, $0,9 \pm 0,1$ y $0,8 \pm 0,3$ para los músculos extraoculares, buccinador y lengua, respectivamente; Figura 41H) y NGF ($0,1 \pm 0,04$,

0,1 \pm 0,02 y 0,1 \pm 0,02 para los músculos extraoculares, buccinador y lengua, respectivamente; Figura 41) no se encontraron diferencias estadísticas entre los tres músculos craneales estudiados. Sin embargo, solo para la musculatura extraocular, con la neurotrofina NT-3 obtuvimos una ratio mayor de 1, que no se observó en los otros músculos. En el caso del NGF, la cantidad de proteína inmadura fue mucho más elevada que la de la proteína madura en todos los músculos analizados.

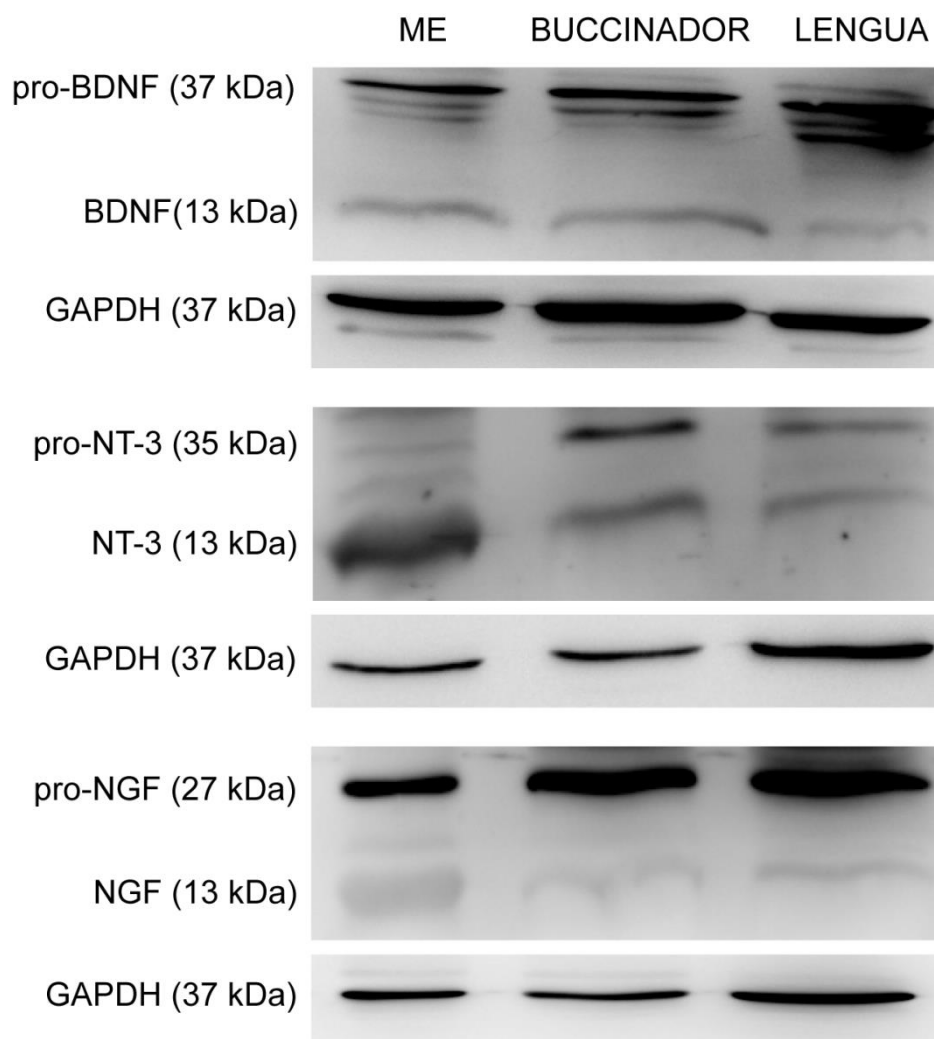


Figura 40. Presencia de neurotrofinas en los músculos craneales de rata. Western blot usando anticuerpos frente a los factores neurotróficos BDNF, NT-3 y NGF en los músculos extraoculares (ME), músculo buccinador y lengua para las formas pro-neurotrofinas (37, 35 y 27 kDa, respectivamente) y maduras (13 kDa), tomando como referencia la presencia de GAPDH (37 kDa). Se observan bandas de diferente peso molecular representando otras isoformas de las distintas neurotrofinas.

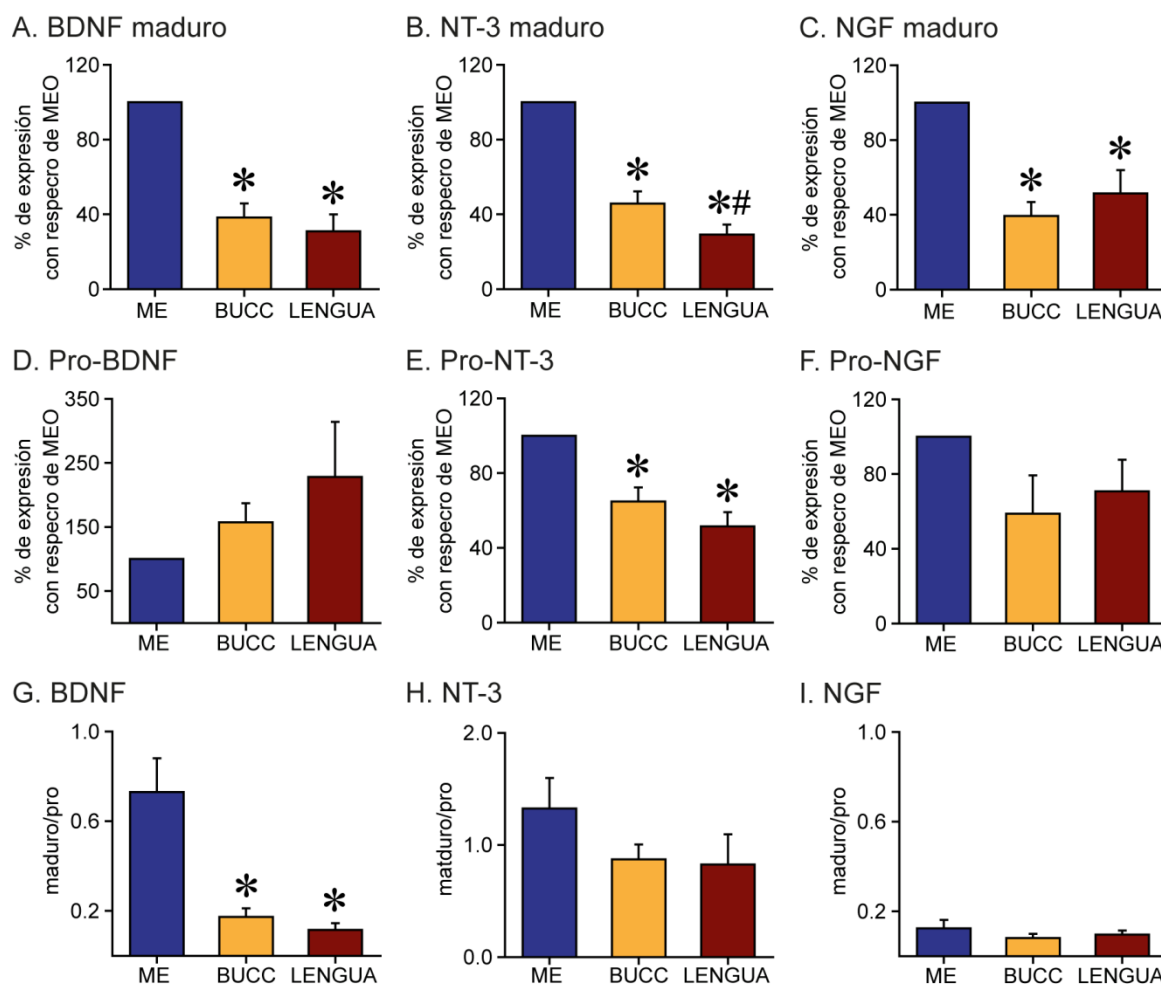


Figura 41. Análisis de la cantidad de neurotrofina en los músculos craneales de la rata. A-C: Diagramas de barras que comparan los valores densitométricos de la forma madura (13 kDa) de BDNF (A), NT-3 (B) y NGF (C) en los músculos extraoculares (ME, barras azules), músculo buccinador (BUCC, barras naranja) y lengua (barras burdeos). D-F: Diagramas de barras como en A-C pero comparando los valores densitométricos de la forma pro-neurotrofina de BDNF (D), NT-3 (E) y NGF (F). G-I: Ratio forma madura/pro-neurotrofina en los músculos craneales analizados para los factores BDNF (G), NT-3 (H) y NGF (I). Los datos se presentan como los valores medios \pm EEM; $n = 6$ ratas. Los asteriscos señalan las diferencias significativas respecto a la musculatura extraocular mientras que almohadilla indica diferencias con el músculo buccinador ($p < 0,05$; ANOVA de un factor, test Holm-Sidak).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han estudiado los efectos de la deaferentación selectiva de las motoneuronas del recto medial del gato adulto. De este modo, se ha caracterizado el papel de sus dos principales aferencias sobre los movimientos oculares en el plano horizontal, así como las propiedades de disparo de dichas neuronas motoras en ausencia de cualquiera de las dos entradas.

Ambas lesiones produjeron alteraciones durante los movimientos oculares, tanto espontáneos, como inducidos por estimulación vestibular. Estos cambios también se reflejaron en las propiedades de disparo de las motoneuronas del recto medial, disminuyendo su sensibilidad a la posición y a la velocidad ocular durante ambos tipos de movimientos. Sin embargo, los efectos producidos variaron en magnitud y duración según el tipo de lesión. Así, los animales con el TAD seccionado presentaron una recuperación funcional tanto del comportamiento ocular como de las propiedades de descarga de las neuronas motoras, que no se observó en los animales con lesión en el FLM.

Por otra parte, los resultados electrofisiológicos correlacionaron con los experimentos morfológicos. Se observó una disminución en la cobertura sináptica somática a corto plazo tras la deaferentación selectiva. Sin embargo, solo en los animales privados de la entrada vestibular se verificó una recuperación a largo plazo tras la lesión. Resultados anatómicos semejantes se obtuvieron en experimentos en la rata 24, 48 o 96 horas tras la sección del TAD o del FLM, que confirmaron la consistencia de los resultados obtenidos en el gato, y proporcionaron un curso temporal más afinado de los cambios sinápticos que ocurren tras ambas lesiones.

Estos resultados señalan una mayor capacidad plástica de los circuitos neuronales en los animales con lesión en el TAD que en los animales carentes de la proyección de las neuronas internucleares del NMOE, indicando la posible generación de nuevas colaterales axonales desde las aferencias no lesionadas. Estos ajustes plásticos pueden estar mediados por factores tróficos, como las neurotrofinas, cuyo contenido aumenta en el soma de las motoneuronas deaferentadas, y que pueden participar en la regulación de la expresión de ciertas proteínas de regeneración o crecimiento axonal, como la proteína GAP-43.

Los cambios en la presencia de neurotrofinas tras la lesión, junto con los resultados obtenidos en trabajos previos (Benítez-Temiño y col., 2004; Davis-López de Carrizosa y col., 2009, 2010; Morcuende y col., 2011, 2013), han puesto de manifiesto la particular sensibilidad

de las motoneuronas oculomotoras a los factores neurotróficos, como se discutirá a continuación.

Por otra parte, estas neuronas presentan ciertas propiedades intrínsecas que las hacen menos vulnerables a la degeneración que tiene lugar durante la ELA (Nimchinsky y col., 2000), como se discutirá con detalle más adelante. En este marco contextual de plasticidad neuronal, se estudió la distribución de neurotrofinas en el sistema oculomotor control, observándose que las motoneuronas oculomotoras presentan un patrón neurotrófico más diverso en comparación con otras neuronas motoras vulnerables a neurodegeneración, lo que les podría conferir una resistencia fisiológica y capacidad plástica mayores frente a diferentes procesos lesivos o neurodegenerativos.

5.1. Correlatos anatómicos

La población de motoneuronas del recto medial se localizó mediante su activación antidrómica, tras la estimulación del III par craneal, en la porción más rostral del NMOC, y en posición dorsolateral. Hacia regiones más caudales dentro del NMOC, las neuronas motoras del recto medial se extendieron hacia posiciones ventrolaterales. Estas premisas fueron confirmadas mediante análisis histológico, corroborando estudios previos, tanto morfológicos como electrofisiológicos en gato (Akagi, 1978; Baker y Highstein, 1978; Gacek, 1974; Miyazaki, 1985; Naito y col., 1974) y rata (Glicksman, 1980; Labandiera-García y col., 1983), que sugieren la existencia de dos subgrupos en la subdivisión del recto medial: un subgrupo dorsolateral que abarca las 3/4 partes más rostrales del núcleo, y un subgrupo, menor y ventrolateral al FLM, más caudal.

La posición anatómica de la proyección contralateral de las neuronas internucleares del NMOE ha sido ampliamente estudiada morfológica (Büttner-Ennever, 2006; Graybiel y Hartweg, 1974) y electrofisiológicamente (Highstein y Baker, 1978; Fuchs y col., 1988). El FLM se observó en una posición medial justo debajo del suelo del IV ventrículo, tanto en gatos como en ratas. Por su parte, el curso de los axones vestibulares del TAD en el tronco del encéfalo ha sido menos investigado. Buchanan (1937) y Gacek (1971) describieron por primera vez el TAD en gatos como una proyección que se originaba desde neuronas vestibulares de segundo orden de la región ventral del NVL homolateral, y que discurría a través de la protuberancia, lateral al FLM. En el presente trabajo, usando biocitina como marcador anterógrado, se ha comprobado que los axones procedentes del NMOE o del NVL terminaron en la subdivisión del recto medial del NMOC contralateral u homolateral, respectivamente. Además, los axones originados desde

ambos núcleos cursan en paralelo. Otros autores han sugerido la existencia de una pequeña proyección contralateral del TAD (Furuya y Markham, 1981), aunque nuestros resultados, junto con los de otros estudios anteriores (Nguyen y col., 1999a), no apoyan esta idea.

Baker y Highstein (1978) observaron la activación ortodrómica a corta latencia de las motoneuronas del recto medial de gatos tras la estimulación eléctrica del NVL. Esta activación desaparecía tras realizar una lesión transversal a nivel del tegmento pontino, entre el FLM y el brachium conjuntivo (Baker y Highstein, 1978; Reisine y Highstein, 1979). A partir de estos trabajos previos, se realizó la sección unilateral del TAD, usando las mismas coordenadas antero-posteriores que para la sección del FLM, pero en posiciones 0,5 y 0,2 mm laterales a la línea media en el gato y la rata, respectivamente, para evitar lesionar el FLM. Además, mediante inmunohistoquímica frente a calretinina, que marca ambas proyecciones (Baizer y Baker, 2006; de la Cruz y col., 1998; Highstein y Holstein, 2006), se pudo visualizar la lesión a nivel del tronco del encéfalo. Asimismo, se observó una reducción del marcaje frente a calretinina a nivel de la subdivisión del recto medial tras la deaferentación selectiva, demostrando la localización adecuada de la lesión y la interrupción de las vías que conectan las motoneuronas del recto medial con sus aferencias.

5.2. Efectos a corto plazo en los movimientos oculares y las propiedades de disparo tras la deaferentación selectiva de las motoneuronas del recto medial

La sección a corto plazo del TAD o del FLM causó alteraciones durante los movimientos espontáneos del ojo homolateral a la lesión. La lesión del FLM produjo la incapacidad del ojo afectado de cruzar la posición primaria hacia posiciones mediales, en la dirección de aducción. De acuerdo con estos resultados, se ha descrito que tras la sección del FLM se produce el síndrome de oftalmoplejia internuclear, que se caracteriza por la imposibilidad de realizar movimientos de aducción del ojo homolateral a la lesión, sin impedir los movimientos de vergencia (de la Cruz y col., 2000; Delgado-García y col., 1986b; Highstein y Baker, 1978). Además, se midió una reducción del rango motor, así como de la amplitud y la velocidad máxima de los sacádicos, tras ambas lesiones. Estos efectos también se observaron en los animales con el TAD lesionado, aunque con menos severidad. De ello se deduce que el TAD tiene una señal insuficiente tanto de velocidad como de posición para mantener por sí solo el patrón de disparo

normal de sus motoneuronas diana, y por tanto, las características normales de los movimientos y las fijaciones oculares.

Asimismo, se observaron alteraciones de los movimientos oculares durante estimulación vestibular tras la deaferentación selectiva a corto plazo. Así, se midieron reducciones de la amplitud de las fases rápidas y de la ganancia durante el reflejo vestíbulo-ocular tras la lesión del FLM, que se asemejan a los resultados obtenidos por estudios previos (de la Cruz y col., 2000). La sección de las aferencias provenientes del NVL produjo efectos similares, pero menos pronunciados, a pesar de su origen vestibular.

Una explicación a los diferentes efectos producidos en el comportamiento ocular tras la sección del TAD o del FLM puede ser debida a diferencias en la extensión de ambos tractos, referida al número de axones. Así, en el presente trabajo, vimos que el FLM es al menos 3 veces más extenso que el TAD, resultados que concuerdan con estudios anteriores (Baker y Highstein, 1978; Carpenter y Carleton, 1983). Además, a diferencia del TAD, por el FLM discurren axones que inervan otras poblaciones oculomotoras, que pueden actuar desencadenando la aducción del ojo como componente secundario del movimiento (Spencer y Porter, 2006). Debido a ello, las alteraciones producidas tras la sección del FLM pueden ser mayores que tras la lesión del TAD. Otra diferencia en la extensión de ambos tractos puede verse en la amplitud del potencial postsináptico excitador provocado en la subdivisión del recto medial tras la estimulación del NMOE o del VIII par craneal, contralateral y homolateral, respectivamente. Así, el potencial que resulta de la estimulación de las neuronas de Deiters es más pequeño que el producido por la estimulación de las neuronas internucleares del NMOE (Baker y Highstein, 1978).

Todas estas modificaciones en el comportamiento ocular del ojo afectado se acompañaron de cambios en las propiedades de disparo de las motoneuronas del recto medial. En la situación control, las neuronas motoras del recto medial presentan una tasa de disparo tónico-fásica correlacionada con la posición y la velocidad del ojo homolateral (de la Cruz y col., 1989; datos presentes), que se asemeja al patrón de descarga de las motoneuronas y neuronas internucleares del NMOE (Delgado-García y col., 1986a, b).

Tras la sección a corto plazo del TAD o del FLM, se redujo la modulación de la señal de disparo relacionada tanto con la posición como con la velocidad, de manera similar a lo que ocurre tras la axotomía de las neuronas del NMOE (Delgado-García y col., 1988; de la Cruz y col., 2000; Davis-López de Carrizosa y col., 2009; Morado-Díaz y col., 2014). Los efectos a corto plazo en el patrón de disparo fueron similares tras los dos tipos de lesión: en ambos casos se redujo la

sensibilidad a la posición y a la velocidad ocular de las motoneuronas del recto medial tanto durante movimientos oculares espontáneos como durante estimulación vestibular.

Sorprendentemente, no se encontraron diferencias destacables en el disparo de las motoneuronas cuando se compararon los efectos de los dos tipos de lesión. Previamente se ha descrito que el TAD lleva información de velocidad de la cabeza hasta la subdivisión del recto medial, pero también cierta información de posición e incluso una mínima señal de velocidad ocular (Highstein y Reisine, 1981; Reisine y col., 1981; Furuya y Markham, 1981, datos presentes), de forma similar al comportamiento de otras neuronas vestibulares de segundo orden (Stahl y Simpson, 1995). Estos mismos resultados se obtuvieron en el presente estudio, donde se observó que el disparo de las neuronas de la región ventral del NVL codificó velocidad de la cabeza durante el reflejo vestíbulo-ocular, pero también cierta posición ocular durante movimientos oculares espontáneos en dirección contralateral, con pequeños brotes y paradas para sacádicos *on* y *off*, respectivamente. Asimismo, el análisis de los registros electrofisiológicos de las neuronas del NVL, demostró una alta sensibilidad a la velocidad ocular durante la estimulación vestibular, además de una ligera sensibilidad a la posición durante movimientos oculares espontáneos y durante el reflejo vestíbulo-ocular. Sin embargo, esta información de posición y velocidad ocular es menor y más inconsistente que la aportada por el FLM (Highstein y Reisine, 1981). Las neuronas internucleares del NMOE descargan en relación a la velocidad y a la posición ocular durante movimientos oculares espontáneos o estimulación vestibular (Delgado-García y col., 1986b; Fuchs y col., 1988, datos presentes). Por lo tanto, las dos aferencias llevan información cualitativa pero no cuantitativamente similar hasta las motoneuronas del recto medial, lo que podría explicar que la eliminación tanto de una entrada como de la otra tenga el mismo efecto sobre el patrón de disparo de las motoneuronas del recto medial. Sin embargo, estos resultados podrían llevar a pensar que ambos tractos son redundantes, considerando al TAD una proyección menor que tendería a desaparecer con la evolución. Sin embargo, las neuronas internucleares del NMOE reciben información del integrador neuronal de posición horizontal que transforma las órdenes de velocidad de las neuronas premotoras en señales de posición. El integrador neuronal, que se encuentra a nivel del núcleo *prepositus hypoglossi* (Delgado-García y col., 1989; Escudero y col., 1992; Escudero y Delgado-García, 1988), depende del estado de alerta del animal, por lo que el TAD puede proporcionar a las motoneuronas del recto medial información de velocidad de la cabeza y cierta señal de posición ocular de forma directa durante estados de alerta baja o durante el sueño, momento en que el integrador de velocidad a posición deja de funcionar (Figura 42). Por lo tanto, la información que llevan tanto el TAD como el FLM interactúan y se coordinan a nivel de

las motoneuronas del recto medial para producir movimientos horizontales conjugados, durante movimientos espontáneos e inducidos por estimulación vestibular (Baker y Highstein, 1978; Reisine y col., 1981; datos presentes).

Anteriormente se ha mostrado que la lesión del FLM produce el síndrome de oftalmoplejia internuclear, que impide los movimientos de aducción más allá de la posición primaria del ojo homolateral a la lesión (de la Cruz y col., 2000) salvo para movimientos de vergencia (Gamlin y col., 1989b). También se ha descrito que las neuronas internucleares del NMOE no llevan una información apropiada de vergencia hasta las motoneuronas del recto medial (Gamlin y col., 1989a). En nuestro estudio, hemos observado que tras la sección del FLM se siguen produciendo movimientos convergentes y divergentes, y que el disparo de la neurona motora modula con el ojo homolateral al registro. Este mismo resultado se obtuvo tras la eliminación de la entrada vestibular del NVL. Todo ello indica, que ni por el FLM ni por el TAD discurre información de vergencia suficiente para producir dichos movimientos. Además de las neuronas internucleares del NMOE, por el FLM también cursan axones descendentes procedentes de neuronas internucleares del NMOC que hacen contacto sináptico con las motoneuronas del recto lateral. Previamente, se ha sugerido que estas neuronas no son las células generadoras de la señal de vergencia (Clendaniel y Mays, 1994). En esta línea, estudios previos señalan el papel de otras neuronas localizadas a nivel de la formación reticular mesencefálica, situadas dorsales y dorsolaterales al NMOC, que proyectan hasta las motoneuronas del recto medial de forma polisináptica, como las células que generan la señal de vergencia necesaria para realizar los movimientos convergentes (Bohlen y col., 2017; Zhang y col., 1992). De hecho, estas neuronas modifican su frecuencia de disparo durante movimientos de vergencia (Zhang y col., 1991; Zhang y col., 1992).

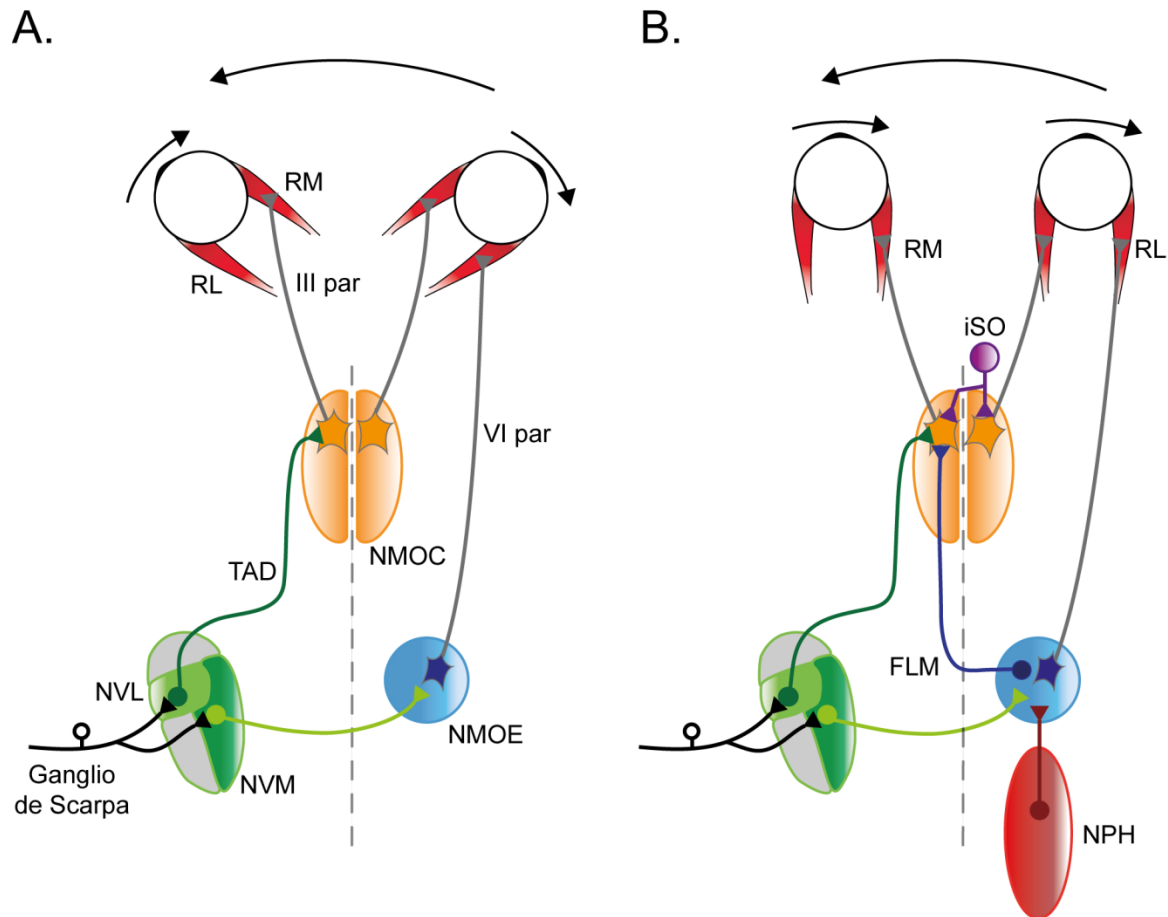


Figura 42. Evolución hipotética de las aferencias a las motoneuronas del recto medial. **A:** Esquema de un hipotético ancestro con visión lateral donde las motoneuronas del recto medial y las motoneuronas del núcleo motor ocular externo (NMOE) contralateral coordinan los desplazamientos de la mirada en el plano horizontal. La única entrada a estas células procedería de la información periférica vestibular que recibe a través de los núcleos vestibulares. **B:** Representación de la coordinación de la mirada en el plano horizontal de los vertebrados con visión frontal. Las motoneuronas del recto medial reciben información vestibular a través del tracto ascendente de Deiters (TAD), además de la proyección procedente de las neuronas internucleares del NMOE, el fascículo longitudinal medial (FLM). Las neuronas internucleares del NMOE reciben información sináptica del núcleo *prepositus hipoglossi* (NPH), que funciona como un integrador neuronal, convirtiendo la señal de velocidad a posición. Este circuito solo funciona en estados de alerta, siendo la vía vestibular la única entrada a las motoneuronas oculomotoras. Además en estos animales ya se ha desarrollado también el circuito de vergencia. NMOC: núcleo motor ocular común. RM: recto medial. RL: recto lateral. III par: tercer par craneal. VI par: sexto par craneal. NVL: núcleo vestibular lateral. NVM: núcleo vestibular medial. iSO: interneuronas supraoculomotoras.

5.3. Efectos a largo plazo en el comportamiento ocular y el disparo tras la deaferentación selectiva de las motoneuronas del recto medial

En el presente trabajo se llevaron a cabo registros de los movimientos oculares y de las propiedades de disparo de las motoneuronas del recto medial hasta 2 meses tras la deaferentación selectiva. Se observó que tras la sección del FLM, las alteraciones en el comportamiento ocular y el disparo de las motoneuronas deaferentadas se mantenían a largo

plazo tras la lesión, aunque sin embargo, se midió cierta mejoría con el tiempo, sin llegar a los valores obtenidos en la situación control. Así, por ejemplo, el ojo afectado pudo explorar cada vez más el hemicampo izquierdo, y además se observó un incremento del rango motor durante movimientos espontáneos. También, se produjo una mejora parcial de la amplitud de las fases rápidas y de la ganancia durante el reflejo vestíbulo-ocular, coincidiendo con resultados previos (de la Cruz y col., 2000). Por otro lado, los animales carentes de la entrada vestibular desarrollaron una recuperación progresiva de los movimientos oculares y de la frecuencia de descarga de las motoneuronas del recto medial, que siempre fue completa a largo plazo, diferenciándose así de los animales con sección en el FLM. Asimismo, se produjo una recuperación del rango motor, la amplitud y velocidad de los sacádicos durante movimientos espontáneos y así como de la amplitud de las fases rápidas y la ganancia durante el reflejo vestíbulo-ocular. Esta mejoría funcional también se vio en la tasa de disparo de las motoneuronas deaferentadas, que se tradujo cuantitativamente en sensibilidades a la posición y a la velocidad ocular similares a la situación control, durante movimientos espontáneos o estimulación vestibular.

Para explicar los fenómenos que desencadenan la recuperación funcional tras una deaferentación parcial, se han propuesto diversos mecanismos compensatorios, como cambios funcionales en la eficacia sináptica o la generación de nuevas sinapsis a partir de aferentes primarias no lesionadas (Filli y Schwab, 2015; Mendell, 1984). Así, se puede producir un aumento de la eficacia sináptica por modificaciones intrínsecas de la excitabilidad, debido a cambios en las propiedades de membrana o a reorganizaciones de los canales y receptores de los terminales postsinápticos (Desai y col., 1999; Marik y col., 2010; Shao y col., 2009; Smith y Zheng, 2013). También puede deberse a cambios estructurales como la generación de nuevas colaterales desde las aferencias no lesionadas. Así, las fibras sanas podrían ocupar los espacios sinápticos vacantes tras la lesión, fenómeno que se ha observado en otras partes del SNC (Aoki y Sugihara, 2012; Cotman y col., 1981; Filli y Schwab, 2015; Frotscher y col., 1997). Las dos aferencias a la subdivisión recto medial llevan la misma información sináptica hasta la motoneurona, y por tanto la vía no lesionada podría contribuir a la recuperación motora y del disparo neuronal observada a largo plazo, principalmente tras la sección del TAD. Finalmente, otra explicación, al menos para la mejora motora, podría ser la contribución de otros músculos extraoculares, de modo que el rango motor cubierto por el ojo derecho podría restaurarse por la acción secundaria y terciaria de otros músculos extraoculares que presentan un componente de aducción (Simpson y Graf, 1981; Spencer y Porter, 2006).

5.4. Cambios en la sinaptología aferente tras la sección unilateral del TAD o del FLM

Para entender los posibles mecanismos que participan en la recuperación funcional completa tras la sección del TAD, se llevaron a cabo estudios morfológicos de la innervación de la población de motoneuronas del recto medial. Investigaciones previas mediante el empleo de trazadores neuronales y microscopía electrónica han demostrado que los terminales axónicos que discurren por el TAD hacen contacto principalmente con el soma y las dendritas proximales de las motoneuronas del recto medial, mientras que los botones que proceden de las neuronas internucleares del NMOE se distribuyen de forma más dispersa, formando sinapsis con dendritas distales, de pequeño y mediano tamaño (Furuya y Markham, 1981; Nguyen y col., 1999a). Esta localización más proximal de los contactos sinápticos procedentes del NVL también se ha demostrado mediante experimentos electrofisiológicos: los potenciales postsinápticos excitadores en las motoneuronas del recto medial tras la estimulación del NMOE contralateral son mayores que los producidos por la estimulación del nervio vestibular homolateral (Baker y Highstein, 1978). Sin embargo, la reversión completa de estos potenciales por inyección de corriente hiperpolarizante se produce antes y a menores niveles de corriente inyectada tras la estimulación del TAD que del FLM, lo que sugiere también una localización más cercana al soma de los terminales sinápticos procedentes de las neuronas de Deiters (Reisine y col., 1981), que permitiría que ambos tractos tuvieran la misma eficacia sináptica sobre la población de neuronas motoras del recto medial.

Nuestros resultados coinciden con estos trabajos previos. Así, tras la sección selectiva del FLM en gatos se observó una reducción mayor en la densidad óptica de sinaptofisina y calretinina, que tras la eliminación de la entrada vestibular, tanto a corto como a largo plazo. Además se estudió el curso temporal a 24, 48 y 96 horas tras la lesión en la rata y se obtuvieron resultados similares. Se observó una reducción progresiva de la densidad óptica de calretinina en el neuropilo tras la axotomía del FLM, que fue máxima a 96 horas post-lesión. Esto indica que tras la interrupción de la vía procedente de las neuronas internucleares del NMOE disminuyó principalmente la innervación a nivel de las dendritas distales de las motoneuronas del recto medial. Asimismo, la disminución producida por la sección del FLM fue mayor que la ocasionada por la del TAD. Sin embargo, con la lesión del TAD en la rata se vio una reducción gradual de calretinina en el neuropilo de la subdivisión del recto medial hasta 48 horas, aumentando significativamente a 96 horas post-lesión. Además, en el gato tras la axotomía del TAD, a corto plazo se observó un menor porcentaje del perímetro cubierto, así como del número de botones

alrededor del soma, que a largo plazo. En la rata, estudiando el curso temporal de la desaparición de los botones inmunopositivos a calretinina se obtuvieron resultados comparables, donde se observó una reducción y un posterior aumento del número de botones de calretinina así como del porcentaje de la densidad lineal alrededor de los somas de las motoneuronas deaferentadas. Todos estos resultados ponen de manifiesto la existencia de posibles mecanismos de compensación estructural que ocupen los espacios vacantes dejados tras la sección del TAD, pero no tras la lesión del FLM, al menos a nivel somático.

Resultados previos de este laboratorio (Pastor y col., 2000) han demostraron que 14 días tras la lesión del FLM ya se había producido la degeneración completa de los axones que discurren por este tracto, así como de los terminales procedentes de las neuronas internucleares del NMOE que habían sido desconectados de sus somas. Tras la lesión, la transmisión sináptica falla rápidamente, como se ha descrito en este estudio, pero la degeneración del axón puede ser un proceso lento y gradual, debido a la finalización del proceso de degeneración Walleriana (Coleman, 2005). Además, se sabe que la degeneración de los terminales sinápticos es más rápida que la del propio axón lesionado (Marques y col., 2008). Asimismo, estudios previos mediante microscopía electrónica en la rata han demostrado que tras la deaferentación de neuronas del colículo superior por la interrupción del tracto retino-colicular, se produce una evidente desorganización de los terminales de la retina entre 24 y 48 horas tras la lesión, que es completa 1 semana tras la misma (Marques y col., 2003, 2008). Resultados similares se han obtenido en otros modelos de lesión a nivel de la corteza (Matthews y col., 1976; Ogata y col., 1982; Wolff y col., 1981), así como en el presente trabajo, observándose un pico máximo en la degeneración de los botones sinápticos alrededor del soma, 48 horas tras la sección selectiva del TAD en la rata. Posteriormente, este número aumentó significativamente, indicando la existencia de mecanismos estructurales plásticos.

En cuanto a la organización sináptica, es probable que estas diferencias entre las aferencias procedentes del NMOE y del NVL tengan un papel importante en la influencia sobre las respuestas fisiológicas postsinápticas de las motoneuronas del recto medial. Analizando la ultraestructura de los dos tipos de terminales, se sabe que ambos hacen contacto exclusivo sobre las motoneuronas del recto medial (Nguyen y col., 1999a). Sin embargo, los terminales de las neuronas internucleares del NMOE poseen una cantidad más elevada de mitocondrias en comparación con los botones sinápticos del TAD, en parte debido a la actividad fisiológica de ambas aferencias, fásica y tónico-fásica para las neuronas del NVL y las neuronas internucleares del NMOE, respectivamente (Baker y Highstein, 1978; Delgado-García y col., 1986b; Reisine y col., 1981). Las dos aferencias son de carácter excitador (Baker y Highstein, 1978), aunque usan

neurotransmisores diferentes, siendo ésta otra disimilitud funcional entre ambos tipos de terminales. Así, las sinapsis formadas por los axones de las neuronas internucleares del NMOE usan glutamato y aspartato como neurotransmisor, mientras que los terminales vestibulares están asociados al neurotransmisor glutamato (Nguyen y col., 1999b).

La localización somática de los terminales sinápticos procedentes del NVL puede ser fundamental para reducir el umbral de activación de las motoneuronas del recto medial, facilitando la sumación espacial de ambas vías, del TAD y del FLM, las cuales transportan señales similares hasta la motoneurona (Nguyen y col., 1999a; Reisine y col., 1981, datos presentes). Asimismo, se reduce el retraso sináptico producido por las neuronas internucleares del NMOE debido a la posición más distal de sus botones sinápticos y a que la información vestibular que discurre por esta proyección hace relevo en una célula más que la aferencia del NVL. Todo ello contribuye y facilita la conjugación de los movimientos oculares en el plano horizontal (Delgado-García y col., 1986b).

5.5. Posibles mecanismos moleculares en la reinervación de las motoneuronas del recto medial tras la deaferentación selectiva

En el presente trabajo, los resultados de los estudios sinaptológicos, así como los datos motores y electrofisiológicos obtenidos, ponen de manifiesto el desarrollo de posibles mecanismos compensatorios morfo-funcionales tras la sección del TAD. Estos mecanismos señalan la generación de nuevas colaterales axonales, que permitan la reinervación de la neurona motora tras la deaferentación selectiva. Este hecho se ve reflejado en la disminución y posterior aumento en el número de botones sinápticos y en el porcentaje del perímetro somático cubierto por los mismos, tanto en gatos como en ratas, tras la sección unilateral del TAD. La vía más probable para ocupar estos espacios sinápticos vacantes tras la deaferentación selectiva sería la proyección aferente no lesionada, procedente de las neuronas internucleares del NMOE. Esto puede explicarse debido a que, en primer lugar, se produce un incremento en el perímetro somático cubierto por botones sinápticos inmunopositivos para calretinina, que es un marcador específico de las neuronas internucleares del NMOE (de la Cruz y col., 1998), además de un aumento en su número total. Y en segundo lugar, debido a la recuperación motora y neurofisiológica de las motoneuronas del recto medial tras la sección del TAD. Las dos aferencias a la subdivisión del recto medial llevan la misma información sináptica hasta la neurona motora (Reisine y col., 1981; datos presentes). Por lo tanto, la información que pierden las motoneuronas del recto medial tras la eliminación de la aferencia vestibular podría recuperarse

mediante la formación de nuevos contactos sinápticos procedentes de las neuronas internucleares del NMOE.

La generación de colaterales axonales emergentes tras procesos de deaferentación se ha demostrado previamente a lo largo del SNC. Así, por ejemplo, tras la lesión parcial de las aferencias al cerebelo procedentes de la oliva inferior, los axones aferentes no lesionados emiten nuevas colaterales axonales 72 horas tras la lesión que hacen contacto sináptico con las células de Purkinje deaferentadas (Rossi y col., 1991a, b; Sugihara y col., 2003). Resultados semejantes se han obtenido en otras regiones del SNC como en el hipocampo (Gage y col., 1983a; Matthews y col., 1976; Steward y col., 1988), en la médula espinal (Bachmann y col., 2014; Zhang y col., 1995; Zhang y col., 2010) o en los sistemas visual (Lund y Lund, 1971) y vestibular (Bäurle y col., 1992). Así, los axones no lesionados desarrollan nuevas prolongaciones terminales para contactar con las dianas previamente denervadas, y que presentan espacios sinápticos vacantes. Igualmente, en la bibliografía existente podemos encontrar numerosos estudios que relacionan la generación de nuevos terminales por parte de las aferencias remanentes tras una denervación selectiva, con la recuperación funcional (Reeves y Steward, 1988; Siegel y col., 2015; Sugihara y col., 2003), indicando la potencialidad que posee el SNC para desarrollar procesos plásticos tras una lesión y su repercusión a nivel funcional.

Sin embargo, es cierto que a pesar de la formación de nuevos botones sinápticos no podemos descartar el desarrollo de otros procesos plásticos como cambios en la eficacia sináptica de terminales de las proyecciones remanentes tras la lesión. Este tipo de plasticidad sináptica ha sido estudiada en numerosos trabajos previos, *in vitro* e *in vivo*, como por ejemplo, mediante la deaferentación de neuronas del hipocampo (Vlachos y col., 2013), vestibulares (Him y Dutia, 2001) o corticales (Desai y col., 1999, 2002), entre otras. No obstante, ambos mecanismos no son excluyentes y pueden ocurrir en paralelo tras procesos lesivos en el SNC. Así, se ha demostrado que tras la denervación de neuronas del hipocampo en ratas adultas se produce la generación de nuevas colaterales axonales desde las aferencias remanentes (Gage y col., 1983a); sin embargo, este proceso está precedido de un incremento de la actividad y la liberación de neurotransmisor desde los terminales presinápticos no lesionados (Gage y col., 1983b, c), indicando que ambos mecanismos tienen lugar de manera simultánea tras la lesión. Todo ello es especialmente posible en el caso de los animales carentes de entrada vestibular, donde la recuperación funcional completa observada a largo plazo puede ser debida al desarrollo de ambos procesos plásticos.

Estos mismos mecanismos compensatorios pueden tener lugar tras la sección del FLM. Sin embargo, los efectos observados tras la eliminación de la entrada sináptica de las neuronas internucleares del NMOE son permanentes, por lo que las motoneuronas del recto medial deaferentadas siguen viéndose afectadas dos meses tras la lesión. Como hemos visto anteriormente, la proyección procedente del NVL está constituida por un menor número de axones que la del FLM. Así tras la sección del FLM, la vía remanente, el TAD, no tiene la potencialidad suficiente para compensar la información sináptica perdida, que llega desde las neuronas internucleares del NMOE hasta la subdivisión del recto medial.

En trabajos anteriores, se ha demostrado que la generación de nuevas colaterales axonales tras procesos lesivos está relacionada con el aumento en la expresión de GAP-43, que es una proteína vinculada con el crecimiento y la estabilidad axonal (Benowitz y col., 1990; Grasselli y Strata, 2013; Lin y col., 1992; Oestreicher y col., 1997). Asimismo, se ha comprobado mediante silenciamiento genético *in vivo* que la proteína GAP-43 es fundamental para el proceso de iniciación y generación de terminales emergentes tras lesiones del sistema nervioso (Allegra Mascaro y col., 2013; Graselli y col., 2011; Graselli y Strata, 2013). Esta proteína se localiza en los conos de crecimiento de las nuevas proyecciones axonales en elongación, sin distribuirse en el soma de la neurona de la que emerge (DiFligia y col., 1990).

En el presente trabajo hemos observado un incremento en la presencia de GAP-43 en el neuropilo de la subdivisión del recto medial del lado lesionado a corto plazo tras la deaferentación selectiva. Este incremento coincide con el rango temporal en que las propiedades fisiológicas de las neuronas motoras deaferentadas están alteradas. Sin embargo, a largo plazo, los niveles de GAP-43 tras ambas lesiones vuelven a ser similares a los observados en el lado control. Así, postulamos que 72 horas tras la lesión, los axones no lesionados estarían generando nuevos terminales axónicos para ocupar los espacios sinápticos dejados al eliminar la otra aferencia. Asimismo, estas colaterales axonales que están en crecimiento aún no habrían contactado con la diana, lo que estaría en concordancia con los resultados electrofisiológicos. Por el contrario, dos meses tras la deaferentación selectiva, las sinapsis ya se habrían establecido, serían funcionales, lo que explicaría la recuperación motora y del disparo neuronal, así como el hecho de que los niveles de GAP-43 en el lado lesionado vuelvan a ser comparables con el lado control. Además, el aumento a corto plazo de GAP-43 en el neuropilo es mayor tras la sección del TAD que tras la lesión del FLM, indicando una mayor potencialidad para generar nuevas colaterales tras la sección del TAD. Esto es debido a que el número de axones procedentes de las neuronas internucleares del NMOE que discurren por el FLM es mayor que los axones de las neuronas vestibulares que forman el TAD, lo que a su vez está relacionado con

la recuperación morfo-funcional que se observa en los animales con el TAD seccionado (Figura 43). Igualmente, estos resultados muestran que tras la sección del FLM también se originan procesos plásticos, los cuales son insuficientes para recuperar la inervación y funcionalidad previa a la lesión.

Por otro lado, el contenido de neurotrofinas en el citoplasma de las motoneuronas del recto medial deaferentadas fue mayor 72 horas tras la sección unilateral del TAD o del FLM que el que mostraron las neuronas motoras del lado control. Además, la cantidad de neurotrofinas en las motoneuronas denervadas volvió a la normalidad 2 meses tras la lesión, sin verse diferencias con los controles. Previamente, se ha demostrado un aumento en el contenido de BDNF, NT-3 y NGF en neuronas de la médula espinal deaferentadas (Johnson y col., 2000; Li y col., 2007; Qin y col., 2006; Widenfalk y col., 2001; Zhou y col., 2009). Por lo tanto, el incremento de neurotrofinas en el citoplasma de las motoneuronas del recto medial denervadas podría tener un origen autocrino. Sin embargo, no podemos descartar que estos factores lleguen a la motoneurona mediante otras vías, como la retrógrada. Así, una posibilidad es el aporte trófico desde la diana, las fibras musculares del recto medial. Se conoce, por ejemplo, que tras la deaferentación de neuronas postganglionares simpáticas cervicales, se produce un aumento en la expresión de NGF en su órgano diana (Keast y Kepper, 2001), lo que estaría relacionado con este aporte trófico retrógrado. Incluso, se ha demostrado que motoneuronas oculomotoras axotomizadas responden a la administración exógena por transporte retrógrado de factores neurotróficos (Davis-López de Carrizosa y col., 2009, 2010).

Este incremento en el contenido de factores neurotróficos en las neuronas del recto medial puede relacionarse con los mecanismos moleculares por los cuales la GAP-43 aumenta tras la deaferentación selectiva. En estudios previos, se ha demostrado que el aporte exógeno de BDNF, NT-3 o NGF incrementa la generación de nuevas colaterales tras la deaferentación selectiva de motoneuronas de la médula espinal (Schell y col., 1994; Scott y col., 2005; Scott y Ramer, 2010), y que la administración de BDNF induce la generación de nuevos terminales axónicos desde la retina, tras la denervación parcial del colículo superior (Tropea y col., 2003). También el BDNF favorece el brote de colaterales tras procesos lesivos a nivel de la médula espinal (Gómez-Pinilla y col., 2004; Jakeman y col., 1988). Además, se ha propuesto que los factores tróficos BDNF, NT-3 y NGF estimulan la expresión de la proteína GAP-43 en axones en crecimiento (Dinocourt y col., 2006; Federoff y col., 1998; Geremia y col., 2010; Gómez-Pinilla y col., 2004; Kobayashi y col., 1997; Mohiuddin y col., 1995; Perrone-Pizzozero y col., 1991; Sanna y col., 2017). Asimismo, tanto las neuronas internucleares del NMOE como las neuronas del NVL expresan en sus membranas los receptores de alta afinidad para las neurotrofinas BDNF, NT-3 y

NGF (Benítez-Temiño y col., 2004). Se postula por tanto que los factores neurotróficos liberados por las motoneuronas deaferentadas podrían estar relacionados con el aumento en la presencia de GAP-43 en el neuropilo de la subdivisión del recto medial, que favorecería la generación de nuevos terminales tras la lesión (Figura 43).

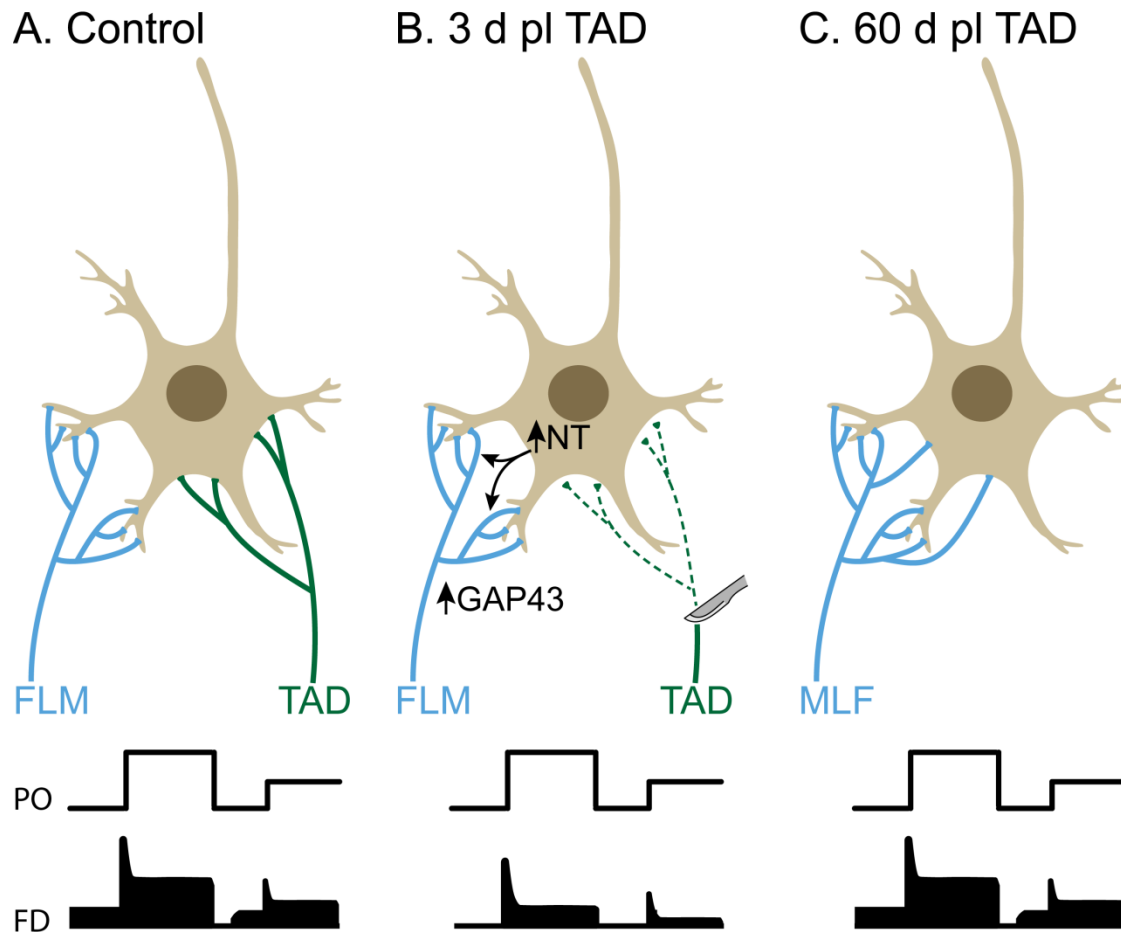


Figura 43. A: Representación esquemática de una motoneurona de la subdivisión recto medial inervada por el fascículo longitudinal medial (FLM) y el tracto ascendente de Deiters (TAD) en control. Nótese que los terminales del FLM terminan preferentemente sobre las dendritas distales, mientras que el TAD contacta preferentemente con el soma. **B y C:** 3 días tras la sección del TAD [3 d post-lesión (pl) TAD], los extremos distales de los axones seccionados están sufriendo la degeneración Walleriana. La ausencia de esta entrada produce una reducción de la modulación del disparo neuronal durante el movimiento ocular. Esta reducción en la actividad sináptica aferente podría producir un incremento en el contenido de neurotrofinas (NT) en las motoneuronas del recto medial deaferentadas. A su vez, este aporte trófico podría inducir la expresión de la proteína GAP-43 en las neuronas internucleares del NMOE, favoreciendo la generación de nuevas colaterales axonales en esta vía, ocupando los espacios sinápticos dejados tras la lesión del TAD (**B**). Este proceso, por el que se forman nuevos contactos sinápticos estaría relacionado con la recuperación morfo-funcional completa observada 2 meses tras la sección del TAD [60 d pl TAD] (**C**).

Así, tanto la proteína GAP-43 como las neurotrofinas aumentan su expresión a corto plazo tras la deaferentación selectiva, periodo en el que aún las propiedades fisiológicas de las motoneuronas permanecen afectadas. Postulamos que ambos eventos están unidos y que desencadenan la recuperación morfo-funcional que ocurre tras la sección del TAD. Dos meses tras la lesión, tanto el contenido de los diferentes factores tróficos en las motoneuronas denervadas como la presencia de GAP-43 se igualan con respecto al lado control, una vez que los mecanismos plásticos y los cambios morfológicos y funcionales han tenido lugar. En resumen, la mayor diferencia entre la sección del TAD o del FLM es la recuperación morfo-funcional tras la eliminación de la entrada procedente del NVL, que no ocurre tras la lesión del FLM. Esta recuperación podría explicarse mediante la generación de nuevos terminales desde las neuronas internucleares del NMOE. Además, todos estos procesos plásticos podrían estar dirigidos por un incremento en el contenido de factores neurotróficos en las motoneuronas del recto medial deaferentadas, que mediarían el aumento en la expresión de GAP-43 en las colaterales axonales en crecimiento (Figura 43).

5.6. Distribución trófica en sistemas motores craneales

La distribución de neurotrofinas en las motoneuronas de los núcleos del sistema oculomotor no había sido estudiada previamente. Los resultados obtenidos a partir de las tinciones inmunohistoquímicas y los Western blots realizados nos permiten concluir que los distintos núcleos oculomotores presentan un patrón neurotrófico similar en la rata adulta. Las motoneuronas oculomotoras son mayoritariamente inmunopositivas para los factores neurotróficos BDNF y NT-3, mientras que la neurotrofina NGF se concentra en los procesos dendríticos distribuidos por el neuropilo. Además, la musculatura extraocular presenta las tres neurotrofinas estudiadas. Asimismo, observamos que existe una clara diferencia en el contenido de estos factores neurotróficos entre los núcleos troncoencefálicos oculomotores y no oculomotores analizados. Los presentes resultados muestran un gradiente neurotrófico rostro-caudal en la distribución de neurotrofinas, tanto en los núcleos motores como en la musculatura asociada (Figura 44). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos previamente en el encéfalo de humanos (Tang y col., 2010) y ratas (Li y col., 2001), así como en los sistemas musculares (Harandi y col., 2014; Nosrat y col., 2000). Estas diferencias en el aporte trófico de las neuronas motoras del sistema oculomotor podrían ser una de las causas del comportamiento diferencial de estas neuronas ante la neurodegeneración asociada a la ELA. En el siguiente

apartado se discute el origen y las consecuencias funcionales que puede tener este peculiar aporte trófico en la fisiología de las motoneuronas oculomotoras.

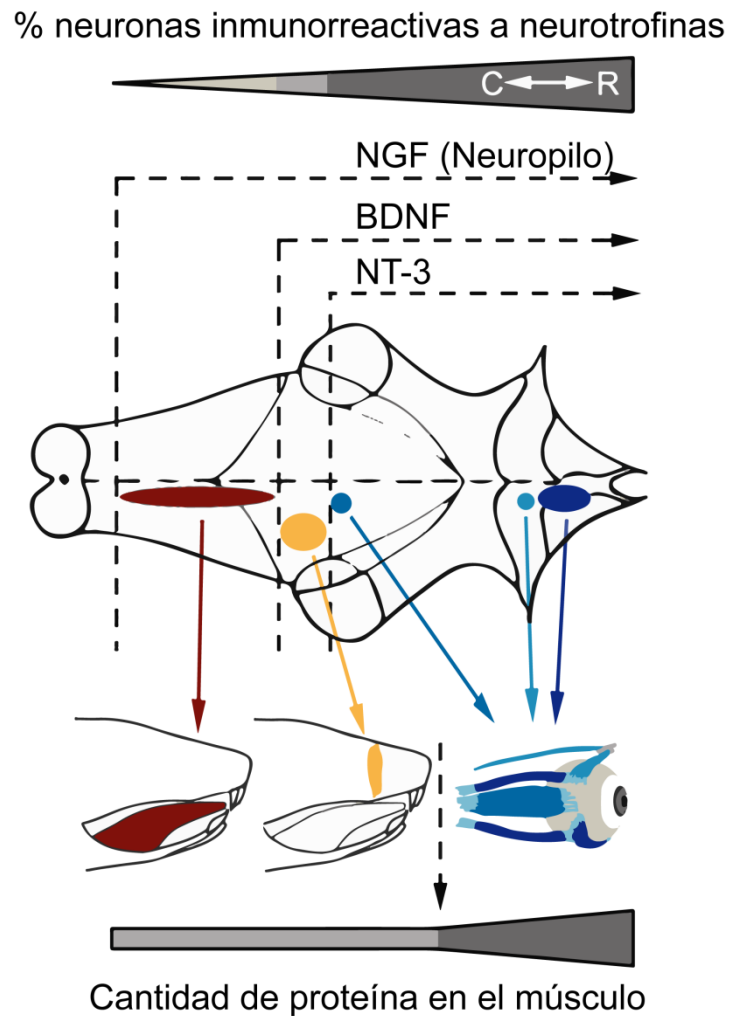


Figura 44. Gradiente rostro-caudal postulado de la influencia de neurotrofinas en los sistemas motores analizados. El esquema muestra el patrón de inmunorreactividad de neurotrofinas de las motoneuronas y la musculatura inervada por estas en el sistema oculomotor (azul), facial (naranja) e hipogloso (burdeos). Nótese que los sistemas motores situados más caudales en el tronco del encéfalo están menos enriquecidos en factores neurotróficos, tanto en diversidad (motoneuronas) como en cantidad (músculos). C: caudal; R: rostral.

5.6.1. Presencia de BDNF en las motoneuronas del sistema oculomotor y facial y de NT-3 solo en las motoneuronas oculomotoras

La mayoría de las motoneuronas del NMOC, NMOT y NMOE fueron inmunopositivas para BDNF y NT-3. Además, casi la totalidad de las motoneuronas del núcleo facial también contenían BDNF, mientras que solo unas pocas de ellas fueron inmunorreactivas para NT-3. Por otro lado, se observaron escasas neuronas motoras del núcleo hipogloso inmunorreactivas para BDNF o NT-3. El inmunomarcaje para BDNF o NT-3 se concentró en el soma de la motoneurona. Este marcaje no es un indicador directo de la expresión genética de estos factores por parte de la neurona, debido a que se conoce el aporte trófico hacia las motoneuronas por diferentes vías como la retrógrada, anterógrada o paracrina, además de propia o autocrina (DiStefano y col., 1992; Korsching, 1993; Reynolds y col., 2000).

En relación con el aporte trófico retrógrado de BDNF y NT-3, en el presente trabajo se ha demostrado que la musculatura extraocular, así como los músculos buccinador y la lengua, presentan ambos factores neurotróficos. Estudios previos han puesto de manifiesto la expresión de los factores neurotróficos BDNF y NT-3 en la musculatura extraocular (Morcuende y col., 2013; Steljes y col., 1999) así como en la unión neuromuscular de la musculatura extraocular de roedores (Harandi y col., 2014, 2016). Además se ha demostrado la presencia de los receptores TrkB y TrkC específicos para BDNF y NT-3, respectivamente, en los diferentes núcleos que componen el sistema oculomotor de rata (Morcuende y col., 2011) y gato (Benitez-Temiño y col., 2004), indicando la posible dependencia trófica de las motoneuronas oculomotoras de sus dianas. De hecho, otros trabajos en distintos músculos esqueléticos inervados por motoneuronas craneales y espinales han demostrado la expresión de ambas neurotrofinas en los mismos (Griesbeck y col., 1995; Henderson y col., 1993; Ip y col., 2001; Koliatsos y col., 1993; Maisonpierre y col., 1990).

Asimismo, previamente, en el núcleo facial de ratas adultas se ha confirmado el aporte trófico de BDNF retrógrado por parte de la musculatura a la que inerva (Koliatsos y col., 1993). Además, se sabe que estas motoneuronas expresan en sus membranas el receptor TrkB (Merlio y col., 1992; Yan y col., 1994), pudiendo señalar un sustento neurotrófico retrógrado en estas neuronas derivado de la diana. Incluso, previamente se ha señalado que el aporte exógeno de BDNF o NT-3 por vía retrógrada sobre motoneuronas oculomotoras, o de BDNF sobre las neuronas motoras faciales lesionadas permiten la recuperación del fenotipo morfo-funcional previo a la lesión (Davis-López de Carrizosa y col., 2009; Yan y col., 1994). Sin embargo, aunque el porcentaje de motoneuronas positivas para BDNF fue similar al obtenido en los núcleos del

sistema oculomotor, la cantidad de neurotrofina madura así como la ratio forma madura/precursora fue menor en el músculo buccinador que en la musculatura extraocular, indicando una mayor presencia de la isoforma pro-BDNF en el músculo buccinador que en la musculatura extraocular, lo que puede indicar una menor capacidad para activar la vía preferente a través del TrkB en el sistema motor facial que en el oculomotor (Mowla y col., 2001).

Por otro lado, casi la totalidad de las motoneuronas del núcleo hipogloso fueron inmunonegativas para este factor. Estas células no expresan el receptor específico TrkB (Merlio y col., 1992), indicando que podrían no ser sensibles a BDNF. Sin embargo, resultados contradictorios con esta hipótesis se han obtenido en estudios previos, donde el BDNF puede reducir la pérdida de la proteína ChAT tras la axotomía de las motoneuronas del sistema hipogloso (Wang y col., 1997), por lo que al menos tras la lesión estas neuronas responden al aporte de BDNF. De hecho, en el presente trabajo se ha comprobado la presencia de BDNF en la lengua, aunque este BDNF podría no ser secretado por las fibras musculares. Así, Nosrat y col. (2000) no hallaron ARN mensajero de BDNF en las fibras musculares de la lengua, aunque sí demostraron su presencia en las papilas gustativas de la lengua, por lo que el sistema motor lingual podría carecer del aporte trófico retrógrado derivado de la diana. Por todo ello, y aunque durante el procesamiento de las muestras tuvimos especial cuidado en evitar coger papilas gustativas, una explicación para la presencia de BDNF en la musculatura de la lengua podría ser por contaminación de la expresión de este factor en las mismas. Otra posibilidad es que el BDNF medido en la lengua tenga un origen vascular, procedente de las células endoteliales, las cuales expresan este factor (Nakahashi y col., 2000), teniendo una acción paracrina sobre la musculatura y no sobre las motoneuronas troncoencefálicas.

En el presente trabajo, se ha demostrado que pocas motoneuronas faciales y del núcleo hipogloso mostraron inmunorreactividad para NT-3, incluso cuando ambas poblaciones neuronales expresan el receptor específico TrkC (Merlio y col., 1992). Además, la musculatura inervada por estas neuronas presentan dicho factor (músculo buccinador y lengua, respectivamente), aunque en menor cantidad que la musculatura extraocular. Una explicación para esta aparente contradicción puede ser que el NT-3 se una a su receptor específico TrkC localizado en los terminales axonales, ejerciendo su función a este nivel sin ser transportado ni tener efectos sobre el soma, o bien ser transportado en forma de complejo neurotrofina-Trk hasta el soma, donde produce sus efectos, o bien de forma indirecta a través de moléculas intermediarias (Ginty y Segal, 2002; Watson y col., 1999). Esta forma de actuar del NT-3 se ha visto previamente en el sistema visual (von Bartheld y col., 1996). Sin embargo, en concordancia

con nuestros resultados, se ha observado poco o ningún efecto sobre la regulación de la expresión de la proteína ChAT tras la lesión de motoneuronas faciales o del hipogloso con la administración exógena de este factor (Tuszynski y col., 1996; Fernandes y col., 1998).

Aunque el aporte trófico por vía retrógrada está bien definido, no se pueden descartar otras vías independientes por las cuales el BDNF o el NT-3 llegan a las motoneuronas del sistema oculomotor. En primer lugar, se ha demostrado la existencia de un mecanismo anterógrado, a través del cual la célula postsináptica recibe los factores tróficos de la célula presináptica (von Bartheld y col., 1996, 2001). Así, por estudios previos se ha demostrado la expresión de BDNF en dos de las principales aferencias a los núcleos del sistema oculomotor, el núcleo *prepositus hypoglossi* así como en neuronas del complejo vestibular (Büttner-Ennever, 2006; Li y col., 2001). Estas últimas también proyectan hacia las motoneuronas del núcleo facial (Shaw y Baker, 1983), indicando que ambas aferencias pueden servir como fuentes anterógradas de BDNF a las neuronas motoras de los sistemas oculomotor y facial. Además, y como ya hemos discutido antes, puede existir un sustento trófico paracrino, desde células vecinas tales como células gliales, células de Schwann o células endoteliales capilares, entre otras (Davies, 1996; Robinson y col., 1996). Takemoto y col. (2015), demostraron la secreción de BDNF por astrocitos en situación control y bajo condiciones de neurotoxicidad. Por otro lado, estudios previos han puesto de manifiesto la existencia de un sustento autocrino de BDNF o NT-3 (Acheson y col., 1995; Buck y col., 2000; Kokaia y col., 1993; Nishio y col., 1998), es decir, es la propia célula quien secreta los factores neurotróficos. Así pues, el hecho de que las motoneuronas del sistema oculomotor presenten las neurotrofinas en sus somas, como se ha comprobado en este estudio, podría sugerir igualmente que estos factores pueden estar actuando de forma autocrina. Sin embargo, los experimentos que se presentan no pueden asegurar su origen, es decir, si son sintetizadas por la propia neurona o si provienen de otras células. En el caso de que fuera sintetizada por la propia neurona, dichas moléculas no serían suficientes para mantener las propiedades de las motoneuronas oculomotoras lesionadas en el adulto, ya que la pérdida de diana, y de su aporte trófico, produce alteraciones en el fenotipo funcional y en la innervación aferente que se recupera con la administración exógena de BDNF y NT-3 (Davis-López de Carrizosa y col., 2009). Puede argumentarse, por lo tanto, que la cantidad de neurotrofinas que la célula puede sintetizar para sí misma no sea suficiente, o que sean necesarios otros factores para recuperar la funcionalidad previa. En conjunto, estos resultados indican que los músculos extraoculares son una fuente fiable de factores neurotróficos para las motoneuronas del sistema oculomotor, y sugieren que las neurotrofinas derivadas de la musculatura extraocular pueden actuar como importantes mensajeros retrógrados regulando la estructura y función de las

motoneuronas extraoculares en mamíferos en comparación con los otros dos sistemas motores estudiados.

5.6.2. El NGF está presente en el neuropilo de los núcleos motores troncoencefálicos

En este estudio, se ha encontrado que la distribución de NGF en los núcleos troncoencefálicos estudiados difiere de la observada para BDNF y NT-3. Las motoneuronas de los diferentes núcleos motores analizados no contenían NGF en el soma, pero esta molécula sí estaba presente en procesos distribuidos por el neuropilo, que surgían de las neuronas motoras. Trabajos previos han demostrado que las motoneuronas del sistema oculomotor expresan el receptor específico TrkA en gato y rata (Benítez-Temiño y col., 2004; Morcuende y col., 2011), y que esta expresión se incrementa tras la axotomía (Morcuende y col., 2011). Por otro lado, se ha confirmado la expresión de NGF por parte de la musculatura extraocular (Davis-López de Carrizosa y col., 2010; Morcuende y col., 2013, datos presentes), por lo que se podría esperar que las motoneuronas oculomotoras recibieran este factor de manera retrógrada (Grimes y col., 1996). También, Davis-López de Carrizosa y col., (2010) demostraron que las motoneuronas oculomotoras axotomizadas eran sensibles a este factor mediante la administración exógena del mismo, y que incluso recuperaba las propiedades del disparo neuronal en estas células. Sin embargo, las motoneuronas faciales y del hipogloso de la rata adulta carecen del receptor TrkA, aunque como ya hemos visto con anterioridad sí que pueden expresar TrkB y TrkC. Resultados similares se han obtenido en otras neuronas craneales y espinales (Henderson y col., 1993; Koliatsos y col., 1991, 1993; Merlio y col., 1992; Piehl y col., 1994). Este hecho puede concordar con que los niveles de NGF maduro observados en el músculo buccinador y en la lengua son menores que los cuantificados en la musculatura extraocular, así como la menor densidad óptica para NGF en el neuropilo de los núcleos facial e hipóglósos en comparación con los núcleos del sistema oculomotor.

Al igual que para los factores neurotróficos BDNF y NT-3, pueden existir otras posibles fuentes para el NGF observado en el neuropilo de los núcleos motores analizados. Así, los procesos neuropílicos inmunorreactivos para NGF pueden proceder de células gliales, ya que previamente se ha demostrado la expresión de esta neurotrofina en astrocitos y microglía, señalando así un aparato trófico de origen paracrino (Sofroniew y col., 2001). Sin embargo, la forma y tamaños de los procesos inmunopositivos para NGF no se asemejan al que presentan estas células gliales. También podría ser que este NGF llegase a las motoneuronas estudiadas a través de sus aferencias, por vía anterógrada (Jacobs y Miller, 1999). Finalmente, la presencia de

NGF en las neuronas motoras podría tener un origen autocrino, sintetizado en el soma y liberado por las dendritas, estando de acuerdo con nuestros resultados, donde procesos en el neuropilo NGF-positivos fueron también inmunorreactivos para ChAT, marcador específico de las motoneuronas.

Así, se puede concluir que la inmunorreactividad para NGF medida en los núcleos del sistema oculomotor y la presencia de este factor en la musculatura extraocular fue mayor que las observadas en los sistemas motores del facial y del hipogloso. Este hecho, junto con que las motoneuronas oculomotoras expresan el receptor específico para NGF, TrkA, a diferencia de otras motoneuronas, craneales o espinales, señala la potencialidad fisiológica y metabólica que posee este factor sobre el sistema oculomotor en comparación con otros sistemas motores.

5.6.3. Influencia trófica en la resistencia a la neurodegeneración durante la ELA de las motoneuronas extraoculares

La ELA es una enfermedad degenerativa de inicio tardío que afecta principalmente a las neuronas motoras somáticas, sin verse diferentes efectos entre motoneuronas espinales y craneales (Rowland y Sneider, 2001). Sin embargo, una característica aún por esclarecer es que en las dos formas de esta enfermedad, esporádica o hereditaria, no todas las motoneuronas son igualmente vulnerables durante el desarrollo de la patología, tanto en humanos como en modelos animales de la misma. Así, las motoneuronas del sistema oculomotor son resistentes a la neurodegeneración en la ELA (Haenggeli y Kato, 2002; Nimchinsky y col., 2000; Reiner y col., 1995). Asimismo, en las primeras etapas de esta enfermedad se observa una pérdida neuronal severa en otros núcleos motores craneales (facial e hipogloso entre ellos) y espinales, produciendo profundos déficits motores (DePaul y col., 1988; Reiner y col., 1995) en quienes la padecen. Esto sugiere que existen ciertas propiedades intrínsecas de algunos sistemas motores que los hacen más susceptibles que otros al daño durante esta enfermedad, por lo que conocer las características que distinguen a las motoneuronas vulnerables de las resistentes a la ELA nos permitirá comprender los mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad, y por tanto, desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en el futuro.

En estudios previos se han puesto de manifiesto distintos aspectos que distinguen a las motoneuronas extraoculares de otras neuronas motoras del tronco del encéfalo. Se han observado diferencias en la cantidad y la proporción de proteínas de unión a calcio. Este enriquecimiento en el contenido de proteínas de unión a calcio podría proporcionarles una

mayor resistencia a la neurodegeneración, debido a la alteración de la homeostasis del calcio observada en la ELA (Dekkers y col., 2004). Así, en trabajos con distintas especies de mamíferos, se ha comprobado que las motoneuronas oculomotoras expresan casi en su totalidad la proteína de unión a calcio parvalbúmina (Alexianu y col., 1994; de la Cruz y col., 1998; Elliot y Snider, 1995; Obal y col., 2006; Reiner y col., 1995), mientras que sólo un porcentaje reducido de las motoneuronas de los núcleos facial e hipogloso lo hacen. Incluso, en motoneuronas espinales se ha descrito la ausencia total de esta proteína (Alexianu y col., 1994; Reiner y col., 1995). Por otro lado, en roedores se ha observado que sólo un pequeño porcentaje de las motoneuronas de los núcleos oculomotores expresan el neuropéptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), mientras que otros núcleos craneales como el facial o el hipogloso, así como neuronas motoras espinales, poseen una mayor proporción de células que lo expresan (Morcuende y col., 2011; Ringer y col., 2012). En ratones mutantes de la enfermedad, se ha comprobado que existe una correlación negativa entre la resistencia a la neurodegeneración y la cantidad de CGRP en las motoneuronas, lo que sugiere que el CGRP podría ser un factor que promueve la muerte de estas células (Ringer y col., 2012).

Además, de las diferencias descritas en el presente trabajo relacionadas con el contenido de neurotrofinas, previamente se han descrito alteraciones en la expresión de otros factores tróficos tanto en las motoneuronas como en la musculatura que inervan (Lunetta y col., 2012; Tova-y-Romo y col., 2014). Así, recientemente se ha descrito que los núcleos del sistema oculomotor de la rata adulta presentan una mayor cantidad del factor trófico VEGF, así como de su receptor Flk-1, que los núcleos facial e hipogloso, en situación control (Silva-Hucha y col., 2017). El VEGF se ha propuesto como un factor trófico y neuroprotector para las neuronas motoras, ya que su disminución se ha relacionado con la degeneración de las motoneuronas en enfermedades motoras como la ELA (Brockington y col., 2006; McCloskey y col., 2008). A parte de ello, el sistema oculomotor se diferencia de otros sistemas motores debido a su sensibilidad a las neurotrofinas. Las motoneuronas extraoculares expresan el receptor específico para el NGF, el receptor TrkA, en el animal adulto, el cual está ausente en otras motoneuronas craneales y espinales (Benítez-Temiño y col., 2004; Henderson y col., 1993; Koliatsos y col., 1991; Morcuende y col., 2011; Tuszynski y col., 1996). Por lo tanto, la acción neurotrófica específica del NGF en las motoneuronas oculares podría también contribuir a su mayor resistencia a la degeneración. Las neuronas motoras extraoculares también responden a las neurotrofinas tras procesos lesivos, recuperando las propiedades del disparo neuronal así como la inervación previa a la axotomía (Davis-López de Carrizosa y col., 2009, 2010). Asimismo, análisis histológicos de pacientes con ELA han demostrado disminuciones en la cantidad de BDNF y NT-3 en

motoneuronas de la medula espinal (Duberley y col., 1997; Nishio y col., 1998), así como incrementos de las formas TrkB no-fosforiladas, señalando una disminución en la señalización trófica durante la enfermedad (Mutoh y col., 2000). Por tanto, una reducción en el aporte neurotrófico puede contribuir a la muerte de la neurona motora y la inversión de esta anomalía podría ser una potencial terapia frente a la misma (Joyce y col., 2011).

Debido a la habilidad de los factores neurotróficos para promover la supervivencia durante el desarrollo, así como recuperar el fenotipo funcional tras procesos lesivos, los convierte en los perfectos candidatos para estar implicados como mediadores en la menor vulnerabilidad de las neuronas oculomotoras en la ELA. En modelos animales, el aporte exógeno de neurotrofinas ha proporcionado resultados muy diversos y opuestos. Así, numerosos trabajos han señalado que la administración exógena de BDNF y NT-3 no protege de la excitotoxicidad por glutamato en neuronas motoras en cultivo (Corse y col., 1999) ni alarga la esperanza de vida en modelos animales de ELA (Park y col., 2009). No obstante, otros estudios han puesto de manifiesto que el aporte de BDNF y NT-3 exógeno incrementa la supervivencia de las motoneuronas así como mejora la función motora en modelos transgénicos de la ELA (Haase y col., 1997; Ikeda y col., 1995; Kaal y col., 1997; Mitsumoto y col., 1994). Sin embargo, ensayos clínicos en pacientes con la enfermedad basados en la administración exógena por vía subcutánea de neurotrofinas, así como de otros factores tróficos no han producido, hasta la fecha, los efectos deseados (Bradley, 1999; Henriques y col., 2010; Gould y Oppenheim, 2011; Ochs y col., 2000). A pesar de este dato, el conjunto de resultados obtenidos en este y otros grupos invita a continuar con estas líneas de investigación, para esclarecer los orígenes de la protección neuronal en los núcleos oculomotores frente la enfermedad de ELA, y alcanzar así una mejor comprensión de las causas que la desencadenan.

En conclusión, se ha observado que las motoneuronas de los núcleos motores del sistema oculomotor contienen BDNF y NT-3 a nivel del soma, y poseen procesos dendríticos NGF-positivos. Asimismo, la musculatura asociada a estos núcleos presentan estos factores tróficos. Además, este patrón neurotrófico es diferente del observado en otros sistemas motores craneales, siendo más enriquecido, reforzando por tanto la hipótesis sobre el importante papel que ejercen las neurotrofinas en el normal funcionamiento del circuito oculomotor. Todo ello, junto con la menor vulnerabilidad de las motoneuronas oculomotoras a la ELA, hace postular que el alto contenido en neurotrofinas en el sistema extraocular podría estar relacionado con la mayor resistencia a la neurodegeneración durante esta enfermedad.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De los resultados expuestos y la discusión de los mismos se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Las neuronas del NVL codifican principalmente velocidad de la cabeza y en menor grado posición y velocidad ocular, a diferencia de las neuronas internucleares del NMOE, que codifican información de posición y velocidad ocular, y en menor medida de velocidad de la cabeza.
2. Se ha demostrado que los axones del TAD cursan paralelos a los del FLM y su proyección sobre las motoneuronas del recto medial es calretinina positiva.
3. La amplitud y conjugación de los movimientos oculares espontáneos se vio reducida transitoriamente tras la sección del TAD o del FLM. Sin embargo, tras la lesión del TAD se observó una recuperación funcional completa. No ocurrió así tras la sección del FLM.
4. Los dos tipos de lesión produjeron una afectación similar del reflejo vestíbulo-ocular, consistiendo en una reducción de la amplitud de fases rápidas y lentas, así como de la ganancia durante hemiciclos *on* y *off*. Los efectos fueron transitorios, produciéndose una recuperación posterior que solamente fue completa tras la lesión del TAD.
5. El patrón de disparo de las neuronas del TAD no codificó movimientos de vergencia y la lesión de esta proyección tampoco los previno, demostrando que esta vía no es necesaria para producir movimientos de vergencia.
6. El análisis de las propiedades de disparo indicó que tras la deafferentación selectiva, las sensibilidades neuronales a la posición y a la velocidad ocular durante movimientos espontáneos del ojo, o durante el reflejo vestíbulo-ocular, se vieron reducidas con respecto a la situación control. A largo plazo, los animales con el TAD seccionado recuperaron los parámetros hasta valores previos a la lesión, mientras que la axotomía del FLM produjo efectos permanentes.

7. Los cambios en la inervación sobre las motoneuronas del recto medial tras la lesión del FLM fueron permanentes y principalmente a nivel del neuropilo. Sin embargo, las alteraciones observadas tras la sección del TAD fueron transitorias, y correlacionaron con cambios en la presencia de la proteína GAP-43. Este resultado coincide con la recuperación funcional observada a largo plazo tras la lesión vestibular. El aumento en la expresión de GAP-43 podría haber facilitado la generación de nuevas colaterales de axones no lesionados de neuronas internucleares del NMOE.

8. Se demostró un incremento en el contenido de las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NGF en la subdivisión del recto medial a corto plazo tras la deaferentación. Este aumento del aporte trófico podría mediar el incremento de la proteína GAP-43, pues ambos hechos ocurren durante el mismo rango temporal tras ambas lesiones.

9. Las motoneuronas del sistema oculomotor y la musculatura asociada a la misma presentan un patrón de distribución para BDNF, NT-3 y NGF más enriquecido que los sistemas motores facial y lingual en situación control. En conjunto, estas diferencias en el aporte trófico, junto a las observadas en la expresión de otras proteínas, podría conferir a las motoneuronas oculomotoras una especial resistencia a la lesión y neurodegeneración.

10. Por último, y a la vista de las conclusiones manifestadas podemos enunciar la siguiente TESIS: Las propiedades regenerativas de dos tipos neuronales no son conmutativas ni estructural ni funcionalmente, es decir, una neurona no reemplaza a otra mientras exista disparidad de patrones de conectividad y electrofisiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

A

- Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM. 1995. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374: 450-453.
- Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG, Appel SH. 1994. The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 36: 846-858.
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 24: 319-335.
- Akagi Y. 1978. The localization of the motor neurons innervating the extraocular muscles in the oculomotor nuclei of the cat and rabbit, using horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 181: 745-761.
- Allegra Mascaro AL, Cesare P, Sacconi L, Grasselli G, Mandolesi G, Maco B, Knott GW, Huang L, De Paola V, Strata P, Pavone FS. 2013. In vivo single branch axotomy induces GAP-43-dependent sprouting and synaptic remodeling in cerebellar cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 10824-10829.
- Aoki H, Sugihara I. 2012. Morphology of single olivocerebellar axons in the denervation-reinnervation model produced by subtotal lesion of the rat inferior olive. *Brain Res* 1449: 24-37.
- Arévalo JC, Wu SH. 2006. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 63: 1523-1537.

B

- Bachmann LC, Lindau NT, Felder P, Schwab ME. 2014. Sprouting of brainstem-spinal tracts in response to unilateral motor cortex stroke in mice. *J Neurosci* 34: 3378-3389.
- Bahill AT, Clark MR, Stark L. 1975. The main sequence, a tool for studying human eye movements. *Math Biosci* 24: 191-204.
- Baizer JS, Baker JF. 2006. Immunoreactivity for calretinin and calbindin in the vestibular nuclear complex of the monkey. *Exp Brain Res* 172: 103-113.
- Baker R, Highstein SM. 1978. Vestibular projections to medial rectus subdivision of oculomotor nucleus. *J Neurophysiol* 41: 1629-1646.
- Barde YA. 1990. The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res* 2: 237-348.
- Barde YA. 1994. Neurotrophic factors: an evolutionary perspective. *J Neurobiol* 25: 1329-1333.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1: 549-553.
- Baron R. 2006. Mechanisms of disease: neuropathic pain-a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2: 95-106.

- Bastrikova N, Gardner GA, Reece JM, Jeromin A, Dudek SM. 2008. Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3123-3127.
- Bäurle J, Gorver BG, Grüsser-Cornehls U. 1992. Plasticity of GABAergic terminals in Deiters' nucleus of weaver mutant and normal mice: a quantitative light microscope study. *Brain Res* 591: 305-318.
- Becker W. 1989. The neurobiology of saccadic eye movements. *Metrics Rev Oculomot Res* 3: 13-67.
- Beier C, Hovhannisyan A, Weiser S, Kung J, Lee S, Lee DY3, Huie P, Dalal R, Palanker D, Sher A. 2017. Deafferented adult rod bipolar cells create new synapses with photoreceptors to restore vision. *J Neurosci* 37: 4635-4644.
- Belton T, McCrea RA. 2000. Role of the cerebellar flocculus region in cancellation of the VOR during passive whole body rotation. *J Neurophysiol* 84: 1599-1613.
- Benítez-Temiño B, de la Cruz RR, Pastor AM. 2002. Firing properties of axotomized central nervous system neurons recover after graft reinnervation. *J Comp Neurol* 444: 324-344.
- Benítez-Temiño B, Morcuende S, Mentis GZ, de la Cruz RR, Pastor AM. 2004. Expression of Trk receptors in the oculomotor system of the adult cat. *J Comp Neurol* 473: 538-552.
- Benowitz LI, Perrone-Bizzozero NI, Neve RL, Rodriguez W. 1990. GAP-43 as a marker for structural plasticity in the mature CNS. *Prog Brain Res* 86: 309-320.
- Bentea E, Moore C, Deneyer L, Verbruggen L, Churchill MJ, Hood RL, Meshul CK, Massie A. 2017. Plastic changes at corticostriatal synapses predict improved motor function in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 130: 257-267.
- Berman AL. 1968. The brain stem of the cat. A cytoarchitectonic atlas with stereotaxic coordinates. Madison: The University of Wisconsin Press.
- Bessho Y, Nakanishi S, Nawa H. 1993. Glutamate receptor agonists enhance the expression of BDNF mRNA in cultured cerebellar granule cells. *Brain Res Mol Brain Res* 18: 201-208.
- Bhidayasiri R, Plant GT, Leigh RJ. 2000. A hypothetical scheme for the brainstem control of vertical gaze. *Neurology* 54: 1985-1993.
- Blanks RH, Estes MS, Markham CH. 1975. Physiologic characteristics of vestibular first-order canal neurons in the adult cat. II. Response to constant angular acceleration. *J Neurophysiol* 38: 1250-1268.
- Bohlen MO, Warren S, May PJ. 2015. A central mesencephalic reticular formation projection to the supraoculomotor area in macaque monkeys. *Brain Struct Funct* 221: 2209-2229.
- Bohlen MO, Warren S, May PJ. 2017. A central mesencephalic reticular formation projection to medial rectus motoneurons supplying singly and multiply innervated extraocular muscle fibers. *J Comp Neurol* 525: 2000-2018.

- Bothwell M. 2014. NGF, BDNF, NT-3 and NT-4. En: Neurotrophic factors, Handbook of experimental pharmacology 220 (Lewin GR, Carter BD, eds.) pp. 3-15. Berlin: Springer.
- Böttner M, Harde J, Barrenschée M, Hellwig I, Vogel I, Ebsen M, Wedel T. 2013. GDNF induces synaptic vesicle markers in enteric neurons. *Neurosci Res* 77: 128-136.
- Boyle R, Büttner U, Markert G. 1985. Vestibular nuclei activity and eye movements in the alert monkey during sinusoidal optokinetic stimulation. *Exp Brain Res* 57: 362-369.
- Bramham CR, Southard T, Sarvey JM, Herkenham M, Brady LS. 1996. Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. *J Comp Neurol* 368: 371-382.
- Brännström T, Kellerth JO. 1998. Changes in synaptology of adult cat spinal alpha-motoneurons after axotomy. *Exp Brain Res* 118: 1-13.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bradley WG. 1999. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: the BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* 52: 1427-1433.
- Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, Chalkley RJ, Burlingame AL, Hondermarck H. 2015. NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. *Adv Biol Regul* 58: 16-27.
- Brockington A, Wharton SB, Fernando M, Gelsthorpe CH, Baxter L, Ince PG, Lewis CE, Shaw PJ. 2006. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the central nervous system in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65: 26-36.
- Bromberg MB, Pamel G, Stephenson BS, Young AB, Penney JB. 1987. Evidence for reactive synaptogenesis in the ventrolateral thalamus and red nucleus of the rat: changes in high affinity glutamate uptake and numbers of corticofugal fiber terminals. *Exp Brain Res* 69: 53-59.
- Buck CR, Seburn KL, Timothy CC. 2000. Neurotrophic expression by spinal motoneurons in adult and developing rats. *J Comp Neurol* 416: 309-318.
- Buchanan AR. 1937. The course of the secondary vestibular fibers in the cat. *J Comp Neurol* 67: 183-204.
- Buckland ME, Cunningham AM. 1999. Alterations in expression of the neurotrophic factors glial cell line-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor, in the target-deprived olfactory neuroepithelium. *Neuroscience* 90: 333-347.
- Buckmaster PS. 2014. Does mossy fiber sprouting give rise to the epileptic state? *Adv Exp Med Biol* 813: 161-168.
- Büttner U, Kremmyda O. 2007. Smooth pursuit eye movements and optokinetic nystagmus, En: Neuro-ophthalmology neuronal control of eye movements, *Developments in Ophthalmology*, vol. 40 (Straube A, Büttner U, eds) pp. 76-89. Basel: Karger.

- Büttner-Ennever JA. 2006. The extraocular motor nuclei: organization and functional neuroanatomy. En: Neuroanatomy of the oculomotor system, Progress in Brain Research, vol. 151 (Büttner-Ennever JA, ed) pp. 95-126. Amsterdam: Elsevier.
- Büttner-Ennever JA. 2008. Mapping the oculomotor system. Prog Brain Res 171: 3-11.
- Büttner-Ennever JA, Akert K. 1981. Medial rectus subgroups of the oculomotor nucleus and their abducens internuclear input in the monkey. J Comp Neurol 197: 17-27.
- Büttner-Ennever JA, Cohen B, Horn AK, Reisine H. 1996. Pretectal projections to the oculomotor complex of the monkey and their role in eye movements. J Comp Neurol 366: 348-359.
- Büttner-Ennever JA, Cohen B, Pause M, Fries W. 1988. Raphe nucleus of the pons containing omnipause neurons of the oculomotor system in the monkey, and its homologue in man. J Comp Neurol 267: 307-321.
- Büttner-Ennever JA, Eberhorn A, Horn AK. 2003. Motor and sensory innervation of extraocular eye muscles. Ann NY Acad Sci 1004: 40-49.
- Büttner-Ennever JA, Horn AK, Scherberger H, D'Ascanio P. 2001. Motoneurons of twitch and nontwitch extraocular muscle fibers in the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei of monkeys. J Comp Neurol 438: 318-335.
- Butz M, Wörgötter F, van Ooyen A. 2009. Activity-dependent structural plasticity. Brain Res Rev 60: 287-305.

C

- Cabrera B, Portillo F, Pásaro R, Delgado-García JM. 1988. Location of motoneurons and internuclear neurons within the rat abducens nucleus by means of horseradish peroxidase and fluorescent double labeling. Neurosci Lett 87: 1-6.
- Caceres A, Steward O. 1983. Dendritic reorganization in the denervated dentate gyrus of the rat following entorhinal cortical lesions: a Golgi and electron microscopic analysis. J Comp Neurol 214: 387-403.
- Cai D, Shen Y, De Bellard M, Tang S, Filbin MT. 1999. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. Neuron 22: 89-101.
- Caleo M, Medini P, von Bartheld CS, Maffei L. 2003. Provision of brain-derived neurotrophic factor via anterograde transport from the eye preserves the physiological responses of axotomized geniculate neurons. J Neurosci 23: 287-296.
- Cannon SC, Robinson DA. 1987. Loss of the neural integrator of the oculomotor system from brain stem lesion on monkey. J Neurophysiol 57: 1383-1409.
- Calford MB. 2002. Dynamic representational plasticity in sensory cortex. Neuroscience 4: 709-738.
- Carmichael ST, Kathirvelu B, Schweppe CA, Nie EH. 2017. Molecular, cellular and functional events in axonal sprouting after stroke. Exp Neurol 287: 384-394.

- Carmichael ST, Wei L, Rovainen CM, Woolsey TA. 2001. New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. *Neurobiol Dis* 8: 910-922.
- Carleton SC, Carpenter MB. 1983. Afferent and efferent connections of the medial, inferior and lateral vestibular nuclei in the cat and monkey. *Brain Res* 278: 29-51.
- Carpenter MB, Carleton SC. 1983. Comparison of vestibular and abducens internuclear projections to the medial rectus subdivision of the oculomotor nucleus in the monkey. *Brain Res* 274: 144-149.
- Carrascal L, Nieto-González JL, Cameron WE, Torres B, Núñez-Abades P. 2005. Changes during the postnatal development in physiological and anatomical characteristics of rat motoneurons studied *in vitro*. *Brain Res Rev* 49: 377-387.
- Carrascal L, Nieto-González JL, Núñez-Abades P, Torres B. 2006. Temporal sequence of changes in electrophysiological properties of oculomotor motoneurons during postnatal development. *Neuroscience* 140: 1223-1237.
- Causing CG, Gloster A, Aloyz R, Bamji SX, Chang E, Fawcett J, Kuchel G, Miller FD. 1997. Synaptic innervation density is regulated by neuron-derived BDNF. *Neuron* 18: 257-267.
- Chao MV. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many pathways. *Nat Rev Neurosci* 4: 299-309.
- Chao MV, Hempstead BL. 1995. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* 18: 321-326.
- Chubb MC, Fuchs AF. 1982. Contribution of Y group of vestibular nuclei and dentate nucleus of cerebellum to generation of vertical smooth eye movements. *J Neurophysiol* 48: 75-99.
- Chung RY, Mason P, Strassman A, Maciewicz R. 1987. Edinger–Westphal nucleus: cells that project to spinal cord contain corticotropin-releasing factor. *Neurosci Lett* 83: 13-19.
- Citri A, Malenka RC. 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33: 18-41.
- Clary DO, Reichardt LF. 1994. An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11133-11137.
- Clendaniel RA, Mays LE. 1994. Characteristics of antidromically identified oculomotor internuclear neurons during vergence and versional eye movements. *J Neurophysiol* 71:1111-1127.
- Cohen B, Matsuo V, Raphan T. 1977. Quantitative analysis of the velocity characteristics of optokinetic nystagmus and optokinetic after-nystagmus, *J Physiol* 270: 321-344.
- Coleman M. 2005. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 6: 889-898.
- Collins CC, O'Meara D, Scott AB. 1975. Muscle tension during unrestrained human eye movements. *J Physiol* 245: 351-369.

- Collyer E, Catenaccio A, Lemaitre D, Diaz P, Valenzuela V, Bronfman F, Court FA. 2014. Sprouting of axonal collaterals after spinal cord injury is prevented by delayed axonal degeneration. *Exp Neurol* 261: 451-461
- Corse AM, Bilak MM, Bilak SR, Lehar M, Rothstein JD, Kuncel RW. 1999. Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* 6: 335-346.
- Cotman C, Nieto-Sampedro M, Harris E. 1981. Synapse replacement in the nervous system of adult vertebrates. *Physiol Rev* 61: 684-784.
- Coubard AO. 2013. Saccade and vergence eye movements: a review of motor and premotor commands. *Eur J Neurosci* 38: 3384-3397.
- Cullen KE, Van Horn MR. 2011. Brainstem pathways and premotor control. En: *The Oxford handbooks of eye movements* (Liversedge SP, Gilchrist ID, Everling S, eds) pp. 151-172 New York: Oxford University Press.

D

- Darian-Smith C, Lilak A, Alarcón C. 2013. Corticospinal sprouting occurs selectively following dorsal rhizotomy in the macaque monkey. *J Comp Neurol* 521: 2359-2372.
- Davies AM. 1996. Paracrine and autocrine actions of neurotrophic factors. *Neurochem Res* 21: 749-753.
- David S, Aguayo AJ. 1981. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214: 931-933.
- Davis GW, Bezprozvanny I. 2001. Maintaining the stability of neural function: a homeostatic hypothesis. *Annu Rev Physiol* 63: 847-869.
- Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Morcuende S, de la Cruz RR, Pastor AM. 2010. Nerve growth factor regulates the firing patterns and synaptic composition of motoneurons. *J Neurosci* 30: 8308-8319.
- Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Tena JJ, Benítez-Temiño B, Pecero ML, Morcuende SR, de la Cruz RR, Pastor AM. 2009. Complementary actions of BDNF and neurotrophin-3 on the firing patterns and synaptic composition of motoneurons. *J Neurosci* 29: 575-587.
- de la Cruz RR, Escudero M, Delgado-García JM. 1989. Behaviour of medial rectus motoneurons in the alert cat. *Eur J Neurosci* 1: 288-295.
- de la Cruz RR, Delgado-García JM, Pastor AM. 2000. Discharge characteristics of axotomized abducens internuclear neurons in the adult cat. *J Comp Neurol* 427: 391-404.
- de la Cruz RR, Pastor AM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, Delgado-García JM. 1992. Role of GABA in the extraocular motor nuclei of the cat: a postembedding immunocytochemical study. *Neuroscience* 51: 911-929

- de la Cruz RR, Pastor AM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, Delgado-García JM. 1998. Localization of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k in identified extraocular motoneurons and internuclear neurons of the cat. *J Comp Neurol* 390: 377-391.
- De Paola V, Holtmaat A, Knott G, Song S, Wilbrecht L, Caroni P, Svoboda K. 2006. Cell type specific structural plasticity of axonal branches and boutons in the adult neocortex. *Neuron* 49: 861-875.
- DePaul R, Abbs JH, Caligiuri M, Gracco VL, Brooks BR. 1988. Hypoglossal, trigeminal, and facial motoneuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 38: 281-283.
- DeCouto SA, Jones EE, Kudwa AE, Shoemaker SE, Shafer AJ, Brieschke MA, James PF, Vaughn JC, Isaacson LG. 2003. The effects of deafferentation and exogenous NGF on neurotrophins and neurotrophin receptor mRNA expression in the adult superior cervical ganglion. *Brain Res Mol Brain Res* 119: 73-82.
- Degos B, Deniau J-M, Chavez M, Maurice N. 2013. Subthalamic nucleus high-frequency stimulation restores altered electrophysiological properties of cortical neurons in parkinsonian rat. *PLoS ONE* 8: e83608.
- Dekkers J, Bayley P, Dick JR, Schwaller B, Berchtold MW, Greensmith L. 2004. Over-expression of parvalbumin in transgenic mice rescues motoneurons from injury-induced cell death. *Neuroscience* 123: 459-466.
- Delgado-García JM, del Pozo F, Baker R. 1986a. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat-I. Motoneurons. *Neuroscience* 17: 929-952.
- Delgado-García JM, del Pozo F, Baker R. 1986b. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat-II. Internuclear neurons. *Neuroscience* 17: 953-973.
- Delgado-García JM, del Pozo F, Spencer RF, Baker R. 1988. Behavior of neurons in the abducens nucleus of the alert cat. III. Axotomized motoneurons. *Neuroscience* 24: 143-160.
- Delgado-García JM, Vidal PP, Gómez C, Berthoz A. 1989. A neurophysiological study of prepositus hypoglossi neurons projecting to oculomotor and preoculomotor nuclei in the alert cat. *Neuroscience* 29: 291-307.
- Deller T, Frotscher M. 1997. Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Prog Neurobiol* 53: 687-727.
- Deller T, Frotscher M, Nitsch R. 1995. Morphological evidence for the sprouting of inhibitory commissural fibers in response to the lesion of the excitatory entorhinal input to the rat dentate gyrus. *J Neurosci* 15: 6868-6878.
- Desai NS, Cudmore RH, Nelson SB, Turrigiano GG. 2002. Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex. *Nat Neurosci* 5: 783-789.
- Desai NS, Rutherford LC, Turrigiano GG. 1999. Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2: 515-520.

- Dhar M, Brenner JM, Sakimura K, Kano M, Nishiyama H. 2016. Spatiotemporal dynamics of lesion-induced axonal sprouting and its relation to functional architecture of the cerebellum. *Nat Commun* 7: 12938.
- DiFiglia M, Roberts RC, Benowitz LI. 1990. Immunoreactive GAP-43 in the neuropil of adult rat neostriatum: localization in unmyelinated fibers, axon terminals, and dendritic spines. *J Comp Neurol* 302: 992-1001.
- Dinocourt C, Gallagher SE, Thompson SM. 2006. Injury-induced axonal sprouting in the hippocampus is initiated by activation of trkB receptors. *Eur J Neurosci* 24: 1857-1866.
- DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, Alexander C, Boland P, Schick CM, Lindsay RM, Wiegand SJ. 1992. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 8: 983-993.
- Distler C, Mustari MJ, Hoffmann KP. 2002. Cortical projections to the nucleus of the optic tract and dorsal terminal nucleus and to the dorsolateral pontine nucleus in macaques: a dual retrograde tracing study. *J Comp Neurol* 444: 144-158.
- Dityatev A, Dityateva G, Schachner M. 2000. Synaptic strength as a function of post- versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron* 26: 207-217.
- Donaghy M. 1980. The cat's vestibulo-ocular reflex. *J Physiol* 300: 337-351.
- Duberley RM, Johnson IP, Anand P, Leigh PN, Cairns NJ. 1997. Neurotrophin-3 immunoreactivity and TrkC expression in human spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 148: 33-40.
- Dyer AH, Vahdatpour C, Sanfeliu A, Tropea D. 2016. The role of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in brain development, maturation and neuroplasticity. *Neuroscience* 325: 89-99.

E

- Ekester E. 2004. Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative Dis* 1: 88-100.
- Elliott JL, Snider WD. 1995. Parvalbumin is a marker of ALS-resistant motor neurons. *Neuroreport* 6: 449-452.
- Escudero M, de la Cruz RR, Delgado-García JM. 1992. A physiological study of vestibular and prepositus hypoglossi neurones projecting to the abducens nucleus in the alert cat. *J Physiol* 458: 539-560.
- Escudero M, Delgado-García JM. 1988. Behavior of reticular, vestibular and prepositus neurons terminating in the abducens nucleus of the alert cat. *Exp Brain Res* 71: 218-222.
- Evinger C. 1988. Extraocular motor nuclei: location, morphology and afferents. *Rev Oculomot Res* 2: 81-117.
- Evinger C, Baker R, McCrea RA. 1979. Axon collaterals of cat medial rectus motoneurons. *Brain Res* 174: 153-160.

F

- Farhadi HF, Mowla SJ, Petrecca K, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. 2000. Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 20: 4059-4068.
- Federoff HJ, Grabczyk E, Fishman MC. 1988. Dual regulation of GAP-43 gene expression by nerve growth factor and glucocorticoids. *J Biol Biochem* 263: 19290-19295.
- Fernandes KJ, Kobayashi NR, Jasmin BJ, Tetzlaff W. 1998. Acetylcholinesterase gene expression in axotomized rat facial motoneurons is differentially regulated by neurotrophins: correlation with trkB and trkC mRNA levels and isoforms. *J Neurosci* 18: 9936-9947.
- Fernandez C, Goldberg JM. 1971. Physiology of peripheral neurons innervating semicircular canals of the squirrel monkey. II. Response to sinusoidal stimulation and dynamics of peripheral vestibular system. *J Neurophysiol* 34: 661-675.
- Field PM, Coldham DE, Raisman G. 1980. Synapse formation after injury in the adult rat brain: preferential reinnervation of denervated fimbrial sites by axons of the contralateral fimbria. *Brain Res* 189: 103-113.
- Filli L, Schwab ME. 2015. Structural and functional reorganization of propriospinal connections promotes functional recovery after spinal cord injury. *Neural Regen Res* 10: 509-513.
- Flor H. 2002. Phantom-limb pain: characteristics, causes, and treatment. *Lancet Neurol* 1: 182-189.
- Francis HW, Manis PB. 2000. Effects of deafferentation on the electrophysiology of ventral cochlear nucleus neurons. *Hear Res* 149: 91-105.
- Frenkel MY, Bear MF. 2004. How monocular deprivation shifts ocular dominance in visual cortex of young mice. *Neuron* 44: 917-923.
- Frotscher M, Heimrich B, Deller T. 1997. Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci* 20: 218-223.
- Fu SY, Gordon T. 1997. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 14: 67-116.
- Fuchs AF, Kaneko CR, Scudder CA. 1985. Brainstem control of saccadic eye movements. *Annu Rev Neurosci* 8: 307-337.
- Fuchs AF, Robinson DA. 1966. A method for measuring horizontal and vertical eye movement chronically in the monkey. *J Appl Physiol* 21: 1068-1070.
- Fuchs AF, Scudder CA, Kaneko CR. 1988. Discharger pattern and recruitment order of identified motoneurons and internuclear neurons in the monkey abducens nucleus. *60*: 1874-1895.
- Fukushima K, Akao T, Kurkin S, Fukushima J. 2005. Role of vestibular signals in the caudal part of the frontal eye fields in pursuit eye movements in three-dimensional space. *Ann NY Acad Sci* 1039: 272-282.

- Fukushima K, Fukushima J, Kaneko CR, Fuchs AF. 1999. Vertical Purkinje cells of the monkey floccular lobe: simple-spike activity during pursuit and passive whole body rotation. *J Neurophysiol* 82: 787-803.
- Fukushima K, Kaneko CR, Fuchs AF. 1992. The neuronal substrate of integration in the oculomotor system. *Prog Neurobiol* 39: 609-639.
- Furuya N, Markham CH. 1981. Arborization of axons in oculomotor nucleus identified by vestibular stimulation and intra-axonal injection of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 43: 289-303.
- Furuya N, Markham CH. 1982. Direct inhibitory synaptic linkage of pause neurons with burst inhibitory neurons. *Brain Res* 245: 139-143.

G

- Gacek RR. 1971. Anatomical demonstration of the vestibule-ocular projections in the cat. *Acta Otolaryngol Suppl* 293: 1-63.
- Gacek RR. 1974. Localization of neurons supplying the extraocular muscles in the kitten using horseradish peroxidase. *Exp Neurol* 44: 381-403.
- Gage FH, Björklund A, Stenevi U. 1983a. Reinnervation of the partially deafferented hippocampus by compensatory collateral sprouting from spared cholinergic and noradrenergic afferents. *Brain Res* 268: 27-37.
- Gage FH, Björklund A, Stenevi U, Dunnett SB. 1983b. Functional correlates of compensatory collateral sprouting by aminergic and cholinergic afferents in the hippocampal formation. *Brain Res* 268: 39-47.
- Gage FH, Björklund A, Stenevi U. 1983c. Local regulation of compensatory noradrenergic hyperactivity in the partially denervated hippocampus. *Nature* 303: 819-821.
- Gamlin PD, Gnadt JW, Mays LE. 1989a. Abducens internuclear neurons carry an inappropriate signal for ocular convergence. *J Neurophysiol* 62: 70-81.
- Gamlin PD, Gnadt JW, Mays LE. 1989b. Lidocaine-induced unilateral internuclear ophthalmoplegia: effects on convergence and conjugate eye movements. *J Neurophysiol* 62: 82-95.
- Gamlin PD, Yoon K, Zhang H. 1996. The role of cerebro-ponto-cerebellar pathways in the control of vergence eye movements. *Eye (Lond)* 10: 167-71.
- Garcia MM, Edwards R, Brennan GB, Harlan RE. 2000. Deafferentation-induced changes in protein kinase C expression in the rat cochlear nucleus. *Hear Res* 147: 113-124.
- Geremia NM, Pettersson LM, Hasmatalli JC, Hryciw T, Danielsen N, Schreyer DJ, Verge VM. 2010. Endogenous BDNF regulates induction of intrinsic neuronal growth programs in injured sensory neurons. *Exp Neurol* 223: 128-142.
- Gibon J, Barke PA. 2017. Neurotrophins and proneurotrophins: focus on synaptic activity and plasticity in the brain. *Neuroscientist* 1: 1073858417697037.

- Ginty DD, Segal RA. 2002. Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol* 12: 268-274.
- Giolli RA, Blanks RH, Lui F. 2006. The accessory optic system: basic organization with an update on connectivity, neurochemistry, and function. *Prog Brain Res* 151: 407-440.
- Glicksman MA. 1980. Localization of motoneurons controlling the extraocular muscles of the rat. *Brain Res* 188: 53-62.
- Goldberg JM, Fernández C. 1975. Responses of peripheral vestibular neurons to angular and linear accelerations in the squirrel monkey. *Acta Otolaryngol* 80: 101-110.
- Gómez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML. 2013. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Curr Topics Behav Neurosci* 15: 117-136.
- Gómez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Hodgson J, Edgerton VR. 2004. Afferent input modulates neurotrophins and synaptic plasticity in the spinal cord. *J Neurophysiol* 92: 3423-3432.
- González-Forero D, de la Cruz RR, Delgado-García JM, Álvarez FJ, Pastor AM. 2003. Functional alterations of cat abducens neurons after peripheral tetanus neurotoxin injection. *J Neurophysiol* 89: 1878-1890.
- González-Forero D, Alvarez FJ, de la Cruz RR, Delgado-García JM, Pastor AM. 2002. Influence of afferent synaptic innervation on the discharge variability of cat abducens motoneurons. *J Physiol* 541: 283-299.
- González-Forero D, Morcuende S, Alvarez FJ, de la Cruz RR and Pastor AM. 2005. Transynaptic effects of tetanus neurotoxin in the oculomotor system. *Brain* 128: 2175-2188.
- González-Forero D, Pastor AM, Delgado-García JM, de la Cruz RR, Alvarez FJ. 2004. Synaptic structural modification following changes in activity induced by tetanus neurotoxin in cat abducens neurons. *J Comp Neurol* 471: 201-218.
- Goodman CS, Shatz CJ. 1993. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72: 77-98.
- Gould E, Gross CG. 2002. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* 22: 619-623.
- Gould TW, Oppenheim RW. 2011. Motor neuron trophic factors: Therapeutic use in ALS? *Brain Res Rev* 67: 1-39.
- Graybiel AM, Hartweg EA. 1974. Some afferent connections of the oculomotor complex in the cat: an experimental study with tracer techniques. *Brain Res* 81: 543-551.
- Graf W, Gerrits N, Yatim-Dhiba N, Ugolini G. 2002. Mapping the oculomotor system: the power of transneuronal labelling with rabies virus. *Eur J Neurosci* 15: 1557-1562.
- Grantyn A, Berthoz A. 1977. Synaptic actions of the superior colliculus on medial rectus motoneurons in the cat. *Neuroscience* 2: 945-951.

- Grantyn R, Grantyn A. 1978. Morphological and electrophysiological properties of cat abducens motoneurons. *Exp Brain Res* 31: 249-274.
- Grantyn R, Grantyn A, Schaaf P. 1977. Conduction velocity, input resistance and size of cat ocular motoneurons stained with Procion yellow. *Brain Res* 135: 167-173.
- Grasselli G, Mandolesi G, Strata P, Cesare P. 2011. Impaired sprouting and axonal atrophy in cerebellar climbing fibres following *in vivo* silencing of the growth-associated protein GAP-43. *PLoS ONE* 6: e20791.
- Grasselli G, Strata P. 2013. Structural plasticity of climbing fibers and the growth-associated protein GAP-43. *Front Neural Circuits* 7: 25.
- Graziano A, Jones EG. 2009. Early withdrawal of axons from higher centers in response to peripheral somatosensory denervation. *J Neurosci* 29: 3738-3748.
- Griesbeck O, Canossa M, Campana G, Gärtner A, Hoener MC, Nawa H, Kolbeck R, Thoenen H. 1999. Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc Res Tech* 45: 262-275.
- Griesbeck O, Parsadanian AS, Sendtner M, Thoenen H. 1995. Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function. *J Neurosci Res* 42: 21-33.
- Grill R, Murai K, Blesch A, Gage FH, Tuszynski MH. 1997. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* 17: 5560-5572.
- Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS, Topp KS, LaVail JH, Bunnett NW, Mobley WC. 1996. Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* 16: 7950-7964.
- Grosheva M, Nohroudi K, Schwarz A, Rink S, Bendella H, Sarikcioglu L, Klimaschewski L, Gordon T, Angelov DN. 2016. Comparison of trophic factors' expression between paralyzed and recovering muscles after facial nerve injury. A quantitative analysis in time course. *Exp Neurol* 279: 137-148.
- Gruol DL. 2015. IL-6 regulation of synaptic function in the CNS. *Neuropharmacology* 96: 42-54.
- Guo L, Xiong H, Kim JI, Wu YW, Lalchandani RR, Cui Y, Shu Y, Xu T, Ding JB. 2015. Dynamic rewiring of neural circuits in the motor cortex in mouse models of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 18: 1299-1309.
- Gustin SM, Wrigley PJ, Siddall PJ, Henderson LA. 2010. Brain anatomy changes associated with persistent neuropathic pain following spinal cord injury. *Cereb Cortex* 20: 1409-1419.

H

- Haase G, Kennel P, Pettmann B, Vigne E, Akli S, Revah F, Schmalbruch H, Kahn A. 1997. Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat Med* 3: 429-436.
- Haenggeli C, Kato AC. 2002. Differential vulnerability of cranial motoneurons in mouse models with motor neuron degeneration. *Neurosci Lett* 335: 39-43.
- Hagg T, Vahlsing HL, Manthorpe M, Varon S. 1990. Nerve growth factor infusion into the denervated adult rat hippocampal formation promotes its cholinergic reinnervation. *J Neurosci* 10: 3087-3092.
- Hagg T, Vahlsing HL, Manthorpe M, Varon S. 1990. Septohippocampal cholinergic axonal regeneration through peripheral nerve bridges: quantification and temporal development. *Exp Neurol* 109: 153-163.
- Hallböök F, Ibáñez CF, Persson H. 1991. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6: 845-858.
- Han KA, Woo D, Kim S, Choi G, Jeon S, Won SY, Kim HM, Heo WD, Um JW, Ko J. 2016. Neurotrophin-3 regulates synapse development by modulating TrkC-PTP σ synaptic adhesion and intracellular signaling pathways. *J Neurosci* 36: 4816-4831.
- Harandi VM, Gaied AR, Brännström T, Pedrosa Domellöf F1, Liu JX. 2016. Unchanged neurotrophic factors and their receptors correlate with sparing in extraocular muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57: 6831-6842.
- Harandi VM, Lindquist S, Kolan SS, Brännström T, Liu JX. 2014. Analysis of neurotrophic factors in limb and extraocular muscles of mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 9: e109833.
- Harrington AW, St Hillaire C, Zweifel LS, Glebova NO, Philippidou P, Halegoua S, Ginty DD. 2011. Recruitment of actin modifiers to TrkA endosomes governs retrograde NGF signaling and survival. *Cell* 146: 421-434.
- Harris CM, Wolpert DM. 2006. The main sequence of saccades optimizes speed-accuracy trade-off. *Biol Cybern* 95: 21-29.
- Harris JA, Iguchi F, Seidl AH, Lurie DI, Rubel EW. 2008. Afferent deprivation elicits a transcriptional response associated with neuronal survival after a critical period in the mouse cochlear nucleus. *J Neurosci* 28: 10990-11002.
- He Y, Dagher A, Chen Z, Charil A, Zijdenbos A, Worsley K, Evans A. 2009. Impaired small-world efficiency in structural cortical networks in multiple sclerosis associated with white matter lesion load. *Brai* 132: 3366-3379.
- Hebb DO. 1949. *The organization of behavior*. New York: Wiley.

- Henderson CE, Camu W, Mettling C, Gouin A, Poulsen K, Karihaloo M, Rullamas J, Evans T, McMahon SB, Armaninin MP, Berkemeier L, Phillips HS, Rosenthal A. 1993. Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature* 363: 266-270.
- Hejtmancik JF, Cabrera P, Chen Y, M'Hamdi O, Nickerson JM. 2017. Vision. En: *Conn's Translational Neuroscience* (Conn PM, ed) pp. 401-438. Amsterdam: Elsevier.
- Henriques A, Pitzer C, Schneider A. 2010. Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: where do we stand? *Front Neurosci* 4: 1-14.
- Hibbert AP, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. 2003. Neurotrophin-4, alone or heterodimerized with brain-derived neurotrophic factor, is sorted to the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 278: 48129-4836.
- Highstein SM. 1977. Abducens to medial rectus pathway in the MLF: a possible cellular basis for the syndrome of internuclear ophthalmoplegia. En: *Eye movements* (Brooks BA, Bajandas FJ, eds) pp. 127-143. New York: Plenum Publishing Corporation.
- Highstein SM. 1973. Synaptic linkage in the vestibulo-ocular and cerebello-vestibular pathways to the VIth nucleus in the rabbit. *Exp Brain Res* 17: 301-314.
- Highstein SM, Baker R. 1978. Excitatory termination of abducens internuclear neurons on medial rectus motoneurons: relationship to syndrome of internuclear ophthalmoplegia. *J Neurophysiol* 41: 1647-1661.
- Highstein SM, Holstein GR. 2006. The anatomy of the vestibular nuclei. En: *Neuroanatomy of the oculomotor system, Progress in Brain Research*, vol. 151 (Büttner-Ennever JA, ed) pp. 157-203. Amsterdam: Elsevier.
- Highstein SM, Karabelas A, Baker R, McCrea RA. 1982. Comparison of the morphology of physiologically identified abducens motor and internuclear neurons in the cat: a light microscopic study employing the intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 208: 369-381.
- Highstein SM, Reisine H. 1981. The ascending tract of Deiters' and horizontal gaze. *Ann N Y Acad Sci* 374: 102-111.
- Him A, Dutia MB. 2001. Intrinsic excitability changes in vestibular nucleus neurons after unilateral deafferentation. *Brain Res* 908: 58-66.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. 1990. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344: 339-341.
- Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Vaegter CB, Nykjaer A, Jensen K. 2009. Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 29: 12412-12418.
- Holtmaat A, Svoboda K. 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurol* 10: 647-658.

- Holtzman DM, Lowenstein DH. 1995. Selective inhibition of axon outgrowth by antibodies to NGF in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 15: 7062-7070.
- Huang EJ, Reichardt LF. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72: 609-642.
- Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S. 1999. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98: 739-755.

I

- Ikeda K, Klinkosz B, Greene T, Lindsay R, Mitsumoto H. 1995. Effects of brain-derived neurotrophic factor on motor dysfunction in wobbler mouse motor neuron disease. *Ann Neurol* 37: 505-511.
- Ip FC, Cheung J, Ip NI. 2001. The expression profiles of neurotrophins and their receptors in rat and chicken tissues during development. *Neurosci Lett* 301: 107-110.
- Ip NY, Ibáñez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, Espinosa R 3rd, Squinto SP, Persson H, Yancopoulos GD. 1992. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3060-3064.
- Iwamoto Y, Kitama T, Yoshida K. 1990. Vertical eye movement-related secondary vestibular neurons ascending in medial longitudinal fasciculus in cat I. Firing properties and projection pathways. *J Neurophysiol* 63: 902-917.
- Izawa Y, Sugiuchi Y, Shinoda Y. 1999. Neural organization from the superior colliculus to motoneurons in the horizontal oculomotor system of the cat. *J Neurophysiol* 81: 2597-2611.

J

- Jacobs JS, Miller MW. 1999. Expression of nerve growth factor, p75, and the high affinity neurotrophin receptors in the adult rat trigeminal system: evidence for multiple trophic support systems. *J Neurocytol* 28: 571-595.
- Jain N, Florence SL, Qi HX, Kaas JH. 2000. Growth of new brainstem connections in adult monkeys with massive sensory loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5546-5550.
- Jakeman LB, Wei P, Guan Z, Stokes BT. 1998. Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. *Exp Neurol* 154: 170-184.
- Jamman N, Jordan M, Engelhardt M. 2017. Activity-dependent axonal plasticity in sensory systems. *Neuroscience* S0306-4522(17)30505-5.
- Jiang M, Lee CL, Smith KL, Swann JW. 1998. Spine loss and other persistent alterations of hippocampal pyramidal cell dendrites in a model of early-onset epilepsy. *J Neurosci* 18: 8356-8368.

- Johnson RA, Okragly AJ, Haak-Frendscho M, Mitchell GS. 2000. Cervical dorsal rhizotomy increases brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 expression in the ventral spinal cord. *J Neurosci* 20: RC77.
- Jones KR, Reichardt LF. 1990. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8060-8064.
- Joyce PI, Fratta P, Fisher EM, Acevedo-Arozena A. 2011. SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mamm Genome* 22: 420-448.
- Jucker M, D'Amato F, Mondadori C, Mohajeri H, Magyar J, Bartsch U, Schachner M. 1996. Expression of the neural adhesion molecule L1 in the deafferented dentate gyrus. *Neuroscience* 75: 703-715.
- Jucker M, Mondadori C, Mohajeri H, Bartsch U, Schachner M. 1995. Transient upregulation of NCAM mRNA in astrocytes in response to entorhinal cortex lesions and ischemia. *Molec Brain Res* 28: 149-156.
- Judge SJ, Cumming BG. 1986. Neurons in the monkey midbrain with activity related to vergence eye movement and accommodation. *J Neurophysiol* 55: 915-30.

K

- Kaal ECA, Joosten EAJ, Bar PR. 1997. Prevention of apoptotic motoneuron death in vitro by neurotrophins and muscle extract. *Neurochem Int* 20: 193-201.
- Koliatsos VE, Clatterbuck RE, Winslow JW, Cayouette MH, Price DL. 1993. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron* 10: 359-367.
- Koliatsos VE, Crawford TO, Price DL. 1991. Axotomy induces nerve growth factor receptor immunoreactivity in spinal motor neurons. *Brain Res* 549: 297-304.
- Kaneko T, Macara AM, Li R, Hu Y, Iwasaki K, Dunning Z, Firestone E, Horvatic S, Guntur A, Shafer OT, Yang CH, Zhou J, Ye B. 2017. Serotonergic modulation enables pathway-specific plasticity in a developing sensory circuit in *Drosophila*. *Neuron* 95: 623-638.
- Kang H, Schuman EM. 1995. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267: 1658-1662.
- Katz LC, Shatz CJ. 1996. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133-1138.
- Keast JR, Kepper ME. 2001. Differential regulation of trkA and p75 in noradrenergic pelvic autonomic ganglion cells after deafferentation of their cholinergic neighbours. *Eur J Neurosci* 13: 211-20.
- Keck T, Keller GB, Jacobsen RI, Eysel UT, Bonhoeffer T, Hübener M. 2013. Synaptic scaling and homeostatic plasticity in the mouse visual cortex in vivo. *Neuron* 80: 327-334.
- Kilman V, van Rossum MC, Turrigiano GG. 2002. Activity deprivation reduces miniature IPSC amplitude by decreasing the number of postsynaptic GABA(A) receptors clustered at neocortical synapses. *J Neurosci* 22: 1328-1337.

- King WM, Fuchs AF. 1979. Reticular control of vertical saccadic eye movements by mesencephalic burst neurons. *J Neurophysiol* 42: 861-876.
- Klein R, Jing S, Nanduri V., O'Rourke E, Barbacid M. 1991a. The trk protooncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65: 189-197.
- Klein R, Nanduri V, Jing S, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordero-Cardo C, Reichardt LF, Barbacid M. 1991b. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66: 395-403.
- Klöcker N, Jung M, Stuermer CA, Bähr M. 2001. BDNF increases the number of axotomized rat retinal ganglion cells expressing GAP-43, L1, and TAG-1 mRNA--a supportive role for nitric oxide? *Neurobiol Dis* 8: 103-113.
- Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E. 2002. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* 34: 265-273.
- Kobayashi NR, Fan DP, Giehl KM, Bedard AM, Wiegand SJ, Tetzlaff W. 1997. BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and α -tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci* 17: 9583-9595.
- Koda M, Kamada T, Hashimoto M, Murakami M, Shirasawa H, Sakao S, Ino H, Yoshinaga K, Koshizuka S, Moriya H, Yamazaki M. 2004. Adenovirus vector-mediated ex vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor to bone marrow stromal cells promotes axonal regeneration after transplantation in completely transected adult rat spinal cord. *Eur Spine J* 16: 2206-2214.
- Koelsch A, Feng Y, Fink DJ, Mata M. 2010. Transgene-mediated GDNF expression enhances synaptic connectivity and GABA transmission to improve functional outcome after spinal cord contusion. *J Neurochem* 113: 143-152.
- Kokaia Z, Bengzon J, Metsis M, Kokaia M, Persson H, Lindvall O. 1993. Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6711-6712.
- Korsching S. 1993. The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 13: 2739-2748.
- Krauzlis RJ. 2004. Recasting the smooth pursuit eye movement system. *J Neurophysiol* 91: 591-603.
- Krauzlis RJ. 2005. The control of voluntary eye movements: new perspectives. *Neuroscientist* 11: 124-137.
- Krügel U, Bigl V, Eschrich K, Bigl M. 2001. Deafferentation of the septo-hippocampal pathway in rats as a model of the metabolic events in Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci* 19: 263-277.
- Kus L, Borys E, Chu YP, Ferguson SM, Blakely RD, Emborg ME, Kordower JH, Levey AI, Mufson EJ. 2003. Distribution of high affinity choline transporter immunoreactivity in the primate central nervous system. *J Comp Neurol* 463: 341-357.

L

- Labandeira-Garcia JL, Gomez Segade A, Suarez Nuñez JM. 1983. Localisation of motoneurons supplying the extra-ocular muscles of the rat using horseradish peroxidase and fluorescent double labelling. *J Anat* 137: 247-261.
- Labandeira-Garcia JL, Guerra-Seijas MJ, Labandeira-Garcia JA. 1989. The abducens motor and internuclear neurons in the rabbit: retrograde horseradish peroxidase and double fluorescent labeling. *Brain Res* 497: 305-314.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M. 1991. trkC, a new member of trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin 3. *Cell* 66: 967-979.
- Lambo ME, Turrigiano GG. 2013. Synaptic and intrinsic homeostatic mechanisms cooperate to increase L2/3 pyramidal neuron excitability during a late phase of critical period plasticity. *J Neurosci* 33: 8810-8819.
- Langer T, Fuchs AF, Scudder CA, Chubb MC. 1985. Afferents to the flocculus of the cerebellum in the rhesus macaque as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 235: 1-25.
- Lazzouni L, Lepore F. 2014. Compensatory plasticity: time matters. *Front Hum Neurosci* 8: 340.
- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA. 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341: 149-152.
- Lee R, kermani P, Teng KK, Hempstead BL. 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294: 1945-1948.
- Leichnetz GR, Goldberg ME. 1988. Higher centers concerned with eye movement and visual attention: cerebral cortex and thalamus. *Rev Oculomot Res* 2: 365-429.
- Lemitri-Chlieh F, Levine ES. 2010. BDNF evokes release of endogenous cannabinoids at layer 2/3 inhibitory synapses in the neocortex. *J Neurophysiol* 104: 1923-1932.
- Levi-Montalcini R. 1982. Developmental biology and the natural history of nerve growth factor. *Ann Rev Neurosci* 5: 341-362.
- Levi-Montalcini R, Cohen S. 1960. Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals. *Ann NY Acad Sci* 85: 324-341.
- Lewin GR, Barde YA. 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19: 289-317.
- Lewin GR, Carter BD. 2014. Neurotrophic factors. Preface. *Handb Exp Pharmacol* 220: v-vi.
- Li L, Cao J, Zhang S, Wang C, Wang J, Song G, Wang H, Zhang L. 2014. NCAM signaling mediates the effects of GDNF on chronic morphine-induced neuroadaptations. *J Mol Neurosci* 53: 580-589.
- Li M, Dai FR, Du XP, Yang QD, Zhang X, Chen Y. 2012. Infusion of BDNF into the nucleus accumbens of aged rats improves cognition and structural synaptic plasticity through PI3K-ILK-Akt signaling. *Behav Brain Res* 231: 146-153.

- Li S, Nie EH, Yin Y, Benowitz LI, Tung S, Vinters HV, Bahjat FR, Stenzel-Poore MP, Kawaguchi R, Coppola G, Carmichael ST. 2015. GDF10 is a signal for axonal sprouting and functional recovery after stroke. *Nat Neurosci* 18: 1737-1745.
- Li XL, Zhang W, Zhou X, Wang XY, Zhang HT, Qin DX, Zhang H, Li Q, Li M, Wang TH. 2007. Temporal changes in the expression of some neurotrophins in spinal cord transected adult rats. *Neuropeptides* 41: 135-143.
- Li XY, Hashimoto T, Tokuyama W, Miyashita Y, Okuno H. 2001. Spatiotemporal dynamics of brain-derived neurotrophic factor mRNA induction in the vestibulo-olivary network during vestibular compensation. *J Neurosci* 21: 2738-2748.
- Lin LH, Bock S, Carpenter K, Rose M, Norden JJ. 1992. Synthesis and transport of GAP-43 in entorhinal cortex neurons and perforant pathway during lesion-induced sprouting and reactive synaptogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 14: 147-153.
- Lindau NT, Bänninger BJ, Gullo M, Good NA, Bachmann LC, Starkey ML, Schwab ME. 2014. Rewiring of the corticospinal tract in the adult rat after unilateral stroke and anti-Nogo-A therapy. *Brain* 137: 739-756.
- Lindholm D, Hamner S, Zirrgiebel U. 1997. Neurotrophins and cerebellar development. *Perspect Dev Neurobiol* 5: 83-94.
- Lisberger SG, Evinger C, Johanson GW, Fuchs AF. 1981. Relationship between eye acceleration and retinal image velocity during foveal smooth pursuit in man and monkey. *J Neurophysiol* 46: 229-249.
- Lisberger SG, Morris EJ, Tychsen L. 1987. Visual motion processing and sensory-motor integration for smooth pursuit eye movements. *Annu Rev Neurosci* 10: 97-129.
- López-Barneo J, Ribas J, Delgado-García JM. 1981. Identification of prepositus neurons projecting to the oculomotor nucleus in the alert cat. *Brain Res* 214: 174-179.
- Lorente de Nó R. 1947. A study of nerve physiology. *Stud Rockefeller Inst Med Res Repr* 132: 1-548.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. 2005. The ying and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6: 603-614.
- Lund RD, Lund JS. 1971. Modifications of synaptic patterns in the superior colliculus of the rat during development and following deafferentation. *Vision Res Suppl* 3: 281-298.
- Lunetta C, Serafini M, Prella A, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Sassone J, Colciago C, Moggio M, Corbo M, Silani V. 2012. Impaired expression of insulin-like growth factor-1 system in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Muscle Nerve* 45: 200-208.
- Lynch JC, Tian JR. 2006. Cortico-cortical networks and cortico-subcortical loops for the higher control of eye movements. *Prog Brain Res* 151: 461-501.

M

- Maciewicz RJ, Kaneko CR, Highstein SM, Baker R. 1975. Morphophysiological identification of interneurons in the oculomotor nucleus that project to the abducens nucleus in the cat. *Brain Res* 96: 60-65.

- MacGillavry HD, Song Y, Raghavachari S, Blanpied TA. 2013. Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic AMPA receptors. *Neuron* 78: 615-622.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. 1990. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5: 501-509.
- Marik SA, Yamahachi H, McManus JNJ, Szabo G, Gilbert CD. 2010. Axonal dynamics of excitatory and inhibitory neurons in somatosensory cortex. *PLoS Biol* 8: e1000395.
- Markham CH, Furuya N, Bak IJ, Ornitz EM. 1986. Synaptic connections of horizontal canal mediated ascending Deiters tract axons on medial rectus motoneurons in cat. *Auris Nasus Larynx* 13: S1-14.
- Marques SA, Mostacada K, Martinez AM. 2008. Immunoelectron microscopy reveals the presence of neurofilament proteins in retinal terminals undergoing dark degeneration. *Brain Res* 1222: 201-206.
- Marques SA, Taffarel M, Blanco Martinez AM. 2003. Participation of neurofilament proteins in axonal dark degeneration of rat's optic nerves. *Brain Res* 969: 1-13.
- Martinez-Conde S, Macknik SL, Hubel DH. 2004. The role of fixational eye movements in visual perception. *Nat Rev Neurosci* 5: 229-240.
- Martinez-Monedero R, Corrales EC, Cuajungco MP, Heller S, Edge ASB. 2006. Reinnervation of hair cells by auditory neurons after selective removal of spiral ganglion neurons. *J Neurobiol* 66: 319-331.
- Massey PV, Bashir ZI. 2007. Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci* 30: 176-184.
- Matthews DA, Cotman C, Lynch G. 1976. An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration. *Brain Res* 115: 1-21.
- Matz J, Gilyan A, Kolar A, McCarvill T, Krueger SR. 2010. Rapid structural alterations of the active zone lead to sustained changes in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 8836-8841.
- Maunsell JHR, Van Essen DC. 1983. Functional properties of neurons in middle temporal visual area of the macaque monkey. I. Selectivity for stimulus direction, speed, and orientation. *J Neurophysiol* 49: 1127-1147.
- May PJ, Baker H, Vidal PP, Spencer RF, Baker R. 1987. Morphology and distribution of serotonergic and oculomotor internuclear neurons in the cat midbrain. *J Comp Neurol* 266: 150-170.
- Mays LE, Porter JD. 1984. Neural control of vergence eye movements: activity of abducens and oculomotor neurons. *J Neurophysiol* 52: 743-761.
- Mays LE, Porter JD, Gamlin PD, Tello CA. 1986. Neural control of vergence eye movements: neurons encoding vergence velocity. *J Neurophysiol* 56: 1007-1021.

- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. 1996. Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* 17: 1057-1064.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22: 295-318.
- McAllister AK. 2001. Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 58: 1054-1060.
- McCloskey DP, Hintz TM, Scharfman HE. 2008. Modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in motor neurons and its electrophysiological effects. *Brain Res Bull* 76: 36-44.
- McCrea RA. 1988. The nucleus prepositus. En: *Neuroanatomy of the oculomotor system, Reviews of Oculomotor Research*, vol. 2 (Büttner-Ennever JA, ed) pp. 203-223. Amsterdam: Elsevier.
- McCrea RA, Baker R. 1985. Anatomical connections of the nucleus prepositus of the cat. *J Comp Neurol* 237: 377-407.
- McCrea RA, Strassman A, May E, Highstein SM. 1987. Anatomical and physiological characteristics of vestibular neurons mediating the horizontal vestibulo-ocular reflex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 264: 547-570.
- Merzenich MM, Kaas JH, Wall J, Nelson RJ, Sur M, Felleman D. 1983. Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience* 8: 33-55.
- Mendell LM. 1984. Modifiability of spinal synapses. *Physiol Rev* 64: 260-324.
- Mendell LM, Sassooun EM, Wall PD. 1978. Properties of synaptic linkage from long ranging afferents onto dorsal horn neurones in normal and deafferented cats. *J Phyl* 285: 299-310.
- Merlio JP, Ernfors P, Jaber M, Persson H. 1992. Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 51: 513-532.
- Miles FA. 1998. The neural processing of 3-D visual information: evidence from eye movements. *Eur J Neurosci* 10: 811-822.
- Miller JM, Robins D. 1992. Extraocular muscle forces in alert monkey. *Vision Res* 32: 1099-1113.
- Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM. 1994. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science* 265: 1107-1110.
- Miyazaki S. 1985. Localization of motoneurons in the oculomotor nucleus and their axons in the oculomotor nerve. *Brain Res* 348: 57-63.
- Mohan A, Vanneste S. 2017. Adaptive and maladaptive neural compensatory consequences of sensory deprivation-From a phantom percept perspective. *Prog Neurobiol* 153: 1-17.

- Møller AR. 2001. Symptoms and signs caused by neural plasticity. *Neurol Res* 23: 565-572.
- Morado-Díaz CJ, Matarredona ER, Morcuende S, Talaverón R, Davis-López de Carrizosa MA, de la Cruz RR, Pastor AM. 2014. Neural progenitor cell implants in the lesioned medial longitudinal fascicle of adult cats regulate synaptic composition and firing properties of abducens internuclear neurons. *J Neurosci* 34: 7007-7017.
- Morcuende S, Matarredona ER, Benítez-Temiño B, Muñoz-Hernández R, Pastor AM, de la Cruz RR. 2011. Differential regulation of the expression of neurotrophin receptors in rat extraocular motoneurons after lesion. *J Comp Neurol* 519: 2335-2352.
- Morcuende S, Muñoz-Hernández R, Benítez-Temiño B, Pastor AM, de la Cruz, RR. 2013. Neuroprotective effects of NGF, BDNF, NT-3 and GDNF on axotomized extraocular motoneurons in neonatal rats. *Neuroscience* 250: 31-48.
- Morris EJ, Lisberger SG. 1987. Different responses to small visual errors during initiation and maintenance of smooth-pursuit eye movements in monkeys. *J Neurophysiol* 58: 1351-1369.
- Moschovakis AK, Scudder CA, Highstein, SM. 1996. The microscopic anatomy and physiology of the mammalian saccadic system. *Prog Neurobiol* 50: 133-254.
- Mohiuddin L, Fernandez K, Tomlinson DR, Fernyhough P. 1995. Nerve growth factor and neurotrophin-3 enhance neurite outgrowth and up-regulate the levels of messenger RNA for growth-associated protein GAP-43 and T alpha 1 alpha-tubulin in cultured adult rat sensory neurones. *Neurosci Lett* 185: 20-23.
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. 2001. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276: 12660-12666.
- Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, Petrecca K, Fawcett JP, Seidah NG, Morris SJ, Sossin WS, Murphy RA. 1999. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J Neurosci* 19: 2069-2080.
- Moxon KA, Oliviero A, Aguilar J, Foffani G. 2014. Cortical reorganization after spinal cord injury: always for good? *Neuroscience* 283: 78-94.
- Munson JB, Johnson RD, Mendell LM. 1997. NT-3 increases amplitude of EPSPs produced by axotomized group Ia afferents. *J Neurophysiol* 77: 2209-2212.
- Murphy TH, Corbett D. 2009. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 10: 861-872
- Murphy EH, Garone M, Tashayyod D, Baker RB. 1986. Innervation of extraocular muscles in the rabbit. *J Comp Neurol* 254: 78-90.
- Mustari MJ, Fuchs AF, Kaneko CR, Robinson FR. 1994. Anatomical connections of the primate pretectal nucleus of the optic tract. *J Comp Neurol* 349: 111-128.

- Mutoh T, Sobue G, Hamano T, Kuriyama M, Hirayama M, Yamamoto M, Mitsuma T. 2000. Decreased phosphorylation levels of TrkB neurotrophin receptor in the spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res* 25: 239-245.
- Mysoet J, Dupont E, Bastide B, Canu M-H. 2015. Role of IGF-1 in cortical plasticity and functional deficit induced by sensorimotor restriction. *Behav Brain Res* 290: 117-123.

N

- Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B. 2000. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 470: 113-117.
- Nangle MR, Keast JR. 2009. Deafferentation and axotomy each cause neurotrophin-independent upregulation of c-Jun in rodent pelvic ganglia. *Exp Neurol* 215: 271-280.
- Naito H, Tanimura KI, Taga N, Hosoya Y. 1974. Microelectrode study on the subnuclei of the oculomotor nucleus in the cat. *Brain Res* 81: 215-231.
- Nakamagoe K, Iwamoto Y, Yoshida K. 2000. Evidence for brainstem structures participating in oculomotor integration. *Science* 288: 857-859.
- Nakao S, Sasaki S. 1980. Excitatory input from interneurons in the abducens nucleus to medial rectus motoneurons mediating conjugate horizontal nystagmus in the cat. *Exp Brain Res* 39: 23-32.
- Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82: 163-201.
- Newton JR, Sikes RW, Skavenski AA. 2002. Cross-modal plasticity after monocular enucleation of the adult rabbit. *Exp Brain* 144: 423-429.
- Nguyen LT, Baker R, Spencer RF. 1999a. Abducens internuclear and ascending tract of Deiters inputs to medial rectus motoneurons in the cat oculomotor nucleus: synaptic organization. *J Comp Neurol* 405: 141-159.
- Nguyen LT, Spencer RF. 1999b. Abducens internuclear and ascending tract of Deiters inputs to medial rectus motoneurons in the cat oculomotor nucleus: neurotransmitters. *J Comp Neurol* 411: 73-86.
- Nieto-Gonzalez JL, Jensen K. 2013. BDNF depresses excitability of parvalbumin-positive interneurons through an m-like current in rat dentate gyrus. *PLoS ONE* 8: e67318.
- Nitsch R, Frotscher M. 1993. Transneuronal changes in dendrites of GABAergic parvalbumin-containing neurons of the rat fascia dentata following entorhinal lesion. *Hippocampus* 3: 481-490.
- Nishio T, Sunohara N, Furukawa S. 1998. Neurotrophin switching in spinal motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 9: 1661-1665.

- Nimchinsky EA, Young WG, Yeung G, Shah RA, Gordon JW, Bloom FE, Morrison JH, Hof PR. 2000. Differential vulnerability of oculomotor, facial, and hypoglossal nuclei in G86R superoxide dismutase transgenic mice. *J Comp Neurol* 416: 112-125.
- Nosrat IV, Lindskog S, Seiger A, Nosrat CA. 2000. Lingual BDNF and NT-3 mRNA expression patterns and their relation to innervation in the human tongue: similarities and differences compared with rodents. *J Comp Neurol* 417: 133-152.
- Novikov LN, Novikova LN, Holmberg P, Kellerth J. 2000. Exogenous brain-derived neurotrophic factor regulates the synaptic composition of axonally lesioned and normal adult rat motoneurons. *Neuroscience* 100: 171-181.
- Nys J, Scheyftjens I, Arckens L. 2015. Visual system plasticity in mammals: the story of monocular enucleation-induced vision loss. *Front Syst Neurosci* 9: 60.

O

- Obál I, Engelhardt JI, Siklós L. 2006. Axotomy induces contrasting changes in calcium and calcium-binding proteins in oculomotor and hypoglossal nuclei of Balb/c mice. *J Comp Neurol* 499: 17-32.
- Ochs G, Penn RD, York M, Giess R, Beck M, Tonn J, Haigh J, Malta E, Traub M, Sendtner M, Toyka KV. 2000. A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lat Scler Other Mot Neuron Disord* 1: 201-206.
- Oestreicher AB, De Graan PN, Gispen WH, Verhaagen J, Schrama LH. 1997. B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system. *Prog Neurobiol* 53: 627-686.
- Ogata R, Ikari K, Matsushima M. 1982. Terminal degeneration in the lateral septum of the rat after suprachiasmatic nucleus lesion. *Folia Psychiatr Neurol Jpn* 36: 163-172.
- Ono S, Das VE, Economides JR, Mustari MJ. 2005. Modeling of smooth pursuit-related neuronal responses in the DLPN and NRTP of the rhesus macaque. *J Neurophysiol* 93: 108-116.
- Oppenheim RW. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 453-501.
- Oppenheim RW, Yin QW, Prevette D, Yan Q. 1992. Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature* 360: 755-757.
- Oudega M, Hagg T. 1996. Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 140: 218-229.

P

- Palmgren B, Jin Z, Ma H, Jiao Y, Olivius P. 2010. β -Bungarotoxin application to the round window: An *in vivo* deafferentation model of the inner ear. *Hear Res* 265: 70-76.
- Park BR, Choi MA, Hong SM. 2013. Temporal changes of calbindin expression in the nodulus following unilateral labyrinthectomy in rats. *Neurosci Lett* 555: 47-50.

- Park S, Kim HT, Yun S, Kim IS, Lee J, Lee IS, Park KI. 2009. Growth factor expressing human neural progenitor cell grafts protect motor neurons but do not ameliorate motor performance and survival in ALS mice. *Exp Mol Med* 41: 487-500.
- Pascual-Leone A, Amedi A, Fregni F, Merabet LB. 2005. The plastic human brain cortex. *Annu Rev Neurosci* 28: 377-401.
- Pastor AM, Delgado-García JM, Martínez-Guijarro FJ, López-García C, de la Cruz RR. 2000. Response of abducens internuclear neurons to axotomy in the adult cat. *J Comp Neurol* 427: 370-390.
- Pastor AM, Moreno-López B, de la Cruz RR, Delgado-García JM. 1997. Effects of botulinum neurotoxin type A on abducens motoneurons in the cat: ultrastructural and synaptic alterations. *Neuroscience* 81: 457-478.
- Paxinos G, Watson C. 2007. The mouse brain in stereotaxic coordinates (6th ed). San Diego: Academic Press.
- Pearson AG, Gray CW, Pearson JF, Greenwood JM, During MJ, Dragunow M. 2003. ATF3 enhances c-Jun-mediated neurite sprouting. *Brain Res Mol Brain Res* 120: 38-45.
- Perrone-Bizzozero NI, Neve RL, Irwin N, Lewis S, Fischer I, Benowitz LI. 1991. Post-transcriptional regulation of GAP-43 mRNA levels during neuronal differentiation and nerve regeneration. *Mol Cell Neurosci* 2: 402-409.
- Piehl F, Frisen J, Risling M, Hökfelt T, Cullheim S. 1994. Increased trkB mRNA expression by axotomized motoneurons. *Neuroreport* 5: 697-700.
- Poduri A, Beason-Held LL, Moss MB, Rosene DL, Hyman BT. 1995. CA3 neuronal degeneration follows chronic entorhinal cortex lesions. *Neurosci Lett* 197: 1-4.
- Porter JD, Baker RS, Ragusa RJ, Brueckner JK. 1995. Extraocular muscles: basic and clinical aspects of structure and function. *Surv Ophthalmol* 39: 451-484.
- Proctor W, Frenk S, Taylor B, Roper S. 1979. "Hybrid" synapses formed by foreign innervation of parasympathetic neurons: a model for selectivity during competitive reinnervation. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4695-4699.
- Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. 1990. Body and brain, a trophic theory of neural connections. Cambridge: Harvard University Press.

Q

- Qiao Q, Ma L, Li W, Tsai JW, Yang G, Gan WB. 2016. Long-term stability of axonal boutons in the mouse barrel cortex. *Dev Neurobiol* 76: 252-261.
- Qin DX, Zou XL, Luo W, Zhang W, Zhang HT, Li XL, Zhang H, Wang XY, Wang TH. 2006. Expression of some neurotrophins in the spinal motoneurons after cord hemisection in adult rats. *Neurosci Lett* 410: 222-227.

R

- Raisman G. 1977. Formation of synapses in the adult rat after injury: similarities and differences between a peripheral and a central nervous site. *Phil Trans R Soc Lond B* 278: 349-359.
- Ramer MS, French GD, Bisby MA. 1997. Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG. *Pain* 72: 71-78.
- Ramos-Languren LE, Escobar ML. 2013. Plasticity and metaplasticity of adult rat hippocampal mossy fibers induced by neurotrophin-3. *Eur J Neurosci* 37: 1248-59.
- Reeves TM, Steward O. 1988. Changes in the firing properties of neurons in the dentate gyrus with denervation and reinnervation: implications for behavioral recovery. *Exp Neurol* 102: 37-49.
- Reichardt LF. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1545-1564.
- Reiner A, Medina L, Figueredo-Cárdenas G, Anfinson S. 1995. Brainstem motoneurons pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS. *Exp Neurol* 131: 239-250.
- Reisine H, Highstein SM. 1979. The ascending tract of Deiters' conveys a head velocity signal to medial rectus motoneurons. *Brain Res* 170: 172-176.
- Reisine H, Strassman A, Highstein SM. 1981. Eye position and head velocity signals are conveyed to medial rectus motoneurons in the alert cat by the ascending tract of Deiters'. *Brain Res* 211: 153-157.
- Reynolds AJ, Bartlett SE, Hendry I.A. 2000. Molecular mechanisms regulating the retrograde axonal transport of neurotrophins. *Brain Res Rev* 33: 169-178.
- Riffault B, Medina I, Dumon C, Thalman C, Ferrand N, Friedel P, Gaiarsa JL, Porcher C. 2014. Pro-brain-derived neurotrophic factor inhibits GABAergic neurotransmission by activating endocytosis and repression of GABA_A Receptors. *J Neurosci* 34: 13516-13534.
- Rind HB, Butowt R, von Bartheld CS. 2005. Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J Neurosci* 25: 539-549.
- Ringer C, Weihe E, Schütz B. 2012. Calcitonin gene-related peptide expression levels predict motor neuron vulnerability in the superoxide dismutase 1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 45: 547-554.
- Robinson DA. 1965. The mechanics of human smooth pursuit eye movement. *J Physiol* 180: 569-591.
- Robinson DA. 1975. Oculomotor control signals. Basic mechanisms of ocular motility and their clinical implications (Lennerstrand G, Bach&Rita P, ed) pp 337-374. Londres: Pergamon Press.
- Robinson DA. 1981. The use of control systems analysis in the neurophysiology of eye movements. *Annu Rev Neurosci* 4: 463-503.

- Robinson M, Buj-bello, A, Davies AM. 1996. Paracrine interactions of BDNF involving NGF-dependent embryonic sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 151: 143-151.
- Roosen A, Schober A, Strelau J, Böttner M, Faulhaber J, Bendner G, McIlwrath SL, Seller H, Ehmke H, Lewin GR, Unsicker K. 2001. Lack of neurotrophin-4 causes selective structural and chemical deficits in sympathetic ganglia and their preganglionic innervation. *J Neurosci* 21: 3073-3084.
- Rosenzweig ES, Courtine G, Jindrich DL, Brock JH, Ferguson AR, Strand SC, Nout YS, Roy RR, Miller DM, Beattie MS, Havton LA, Bresnahan JC, Edgerton VR, Tuszynski MH. 2010. Extensive spontaneous plasticity of corticospinal projections after primate spinal cord injury. *Nat Neurosci* 13: 1505-1510.
- Rossi F, Jankovski A, Sotelo C. 1997. Differential regenerative response of Purkinje cell and inferior olivary axons confronted with embryonic grafts: environmental cues versus intrinsic neuronal determinants. *J Comp Neurol* 359: 663-777.
- Rossi F, Wiklund L, van der Want JJ, Strata P. 1991a. Reinnervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibres surviving a subtotal lesion of the inferior olive in the adult rat. I. Development of new collateral branches and terminal plexuses. *J Comp Neurol* 308: 513-535.
- Rossi F, van der Want JJ, Wiklund L, Strata P. 1991b. Reinnervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibres surviving a subtotal lesion of the inferior olive in the adult rat. II. Synaptic organization on reinnervated Purkinje cells. *J Comp Neurol* 308: 536-554.
- Rowland LP, Shneider NA. 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344: 1688-1700.
- Roy JE, Cullen KE. 2003. Brain stem pursuit pathways: dissociating visual, vestibular, and proprioceptive inputs during combined eye-head gaze tracking. *J Neurophysiol* 90: 271-290.
- Rutherford LC, DeWan A, Lauer HM, Turrigiano GG. 1997. Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci* 17: 4527-4535.
- Ryu JH, McCabe BF. 1971. Types of neuronal activity in the lateral vestibular nucleus. *Acta Otolaryngol* 72: 288-291.

S

- Sala R, Viegi A, Rossi FM Pizzorusso T, Bonanno G, Raiteri M, Maffei L. 1998. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor increase neurotransmitter release in the rat visual cortex. *Eur J Neurosci* 10: 2185-2191.
- Sanes JR, Yamagata M. 2009. Many paths to synaptic specificity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 161-195.
- Sanna MD, Ghelardini C, Galeotti N. 2017. HuD-mediated distinct BDNF regulatory pathways promote regeneration after nerve injury. *Brain Res* 1659: 55-63.
- Sauvé Y, Sawai H, Rasminsky M. 1995. Functional synaptic connections made by regenerated retinal ganglion cell axons in the superior colliculus of adult hamsters. *J Neurosci* 15: 665-675.
- Scheib J, Höke A. 2013. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol* 9: 668-676.

- Schinder AF, Poo MM. 2000. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *TINS* 23: 639-645.
- Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME. 1994. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367: 170-173.
- Schnell L, Schwab ME. 1993. Sprouting and regeneration of lesioned corticospinal tract fibres in the adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 5: 1156-1171.
- Schubert V, Lebrecht D, Holtmaat A. 2013. Peripheral deafferentation-driven functional somatosensory map shifts are associated with local, not large-scale dendritic structural plasticity. *J Neurosci* 33: 9474-9487.
- Scott AL, Borisoff JF, Ramer MS. 2005. Deafferentation and neurotrophin-mediated intraspinal sprouting: a central role for the p75 neurotrophin receptor. *Eur J Neurosci* 21: 81-92.
- Scott AL, Ramer MS. 2010. Differential regulation of dendritic plasticity by neurotrophins following deafferentation of the adult spinal cord is independent of p75(NTR). *Brain Res* 1323: 48-58.
- Scudder CA, Kaneko CS, Fuchs AF. 2002. The brainstem burst generator for saccadic eye movements. A modern synthesis. *Exp Brain Res* 142: 439-462.
- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Chrétien M, Murphy RA. 1996. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett* 379: 247-250.
- Seymour AB, Andrews EM, Tsai SY, Markus TM, Bollnow MR, Brenneman MM, O'Brien TE, Castro AJ, Schwab ME, Kartje GL. 2005. Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1366-1375.
- Shall MS, Goldberg SJ. 1992. Extraocular motor units: type classification and motoneuron stimulation frequency-muscle unit force relationship. *Brain Res* 587: 291-300.
- Sharma N, D'Arcangelo G, Kleinklaus A, Halegoua S, Trimmer JS. 1993. Nerve growth factor regulates the abundance and distribution of K⁺ channels in PC12 cells. *J Cell Biol* 123: 1835-1843.
- Sharma N, Classen J, Cohen LG. 2013. Neural plasticity and its contribution to functional recovery. *Handb Clin Neurol* 110: 3-12.
- Shao M, Popratiloff A, Hirsch JC, Peusner KD. 2009. Presynaptic and postsynaptic ion channel expression in vestibular nuclei neurons after unilateral vestibular deafferentation. *J Vestib Res* 19: 191-200.
- Sharpe J, Wong AM. 2005. Anatomy and physiology of ocular motor systems. En: Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-ophthalmology vol 3 (Miller NR, Newman NJ, eds) pp 809-885. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Shaw MD, Baker R. 1983. Direct projection from vestibular nuclei to facial nucleus in cats. *J Neurophysiol* 50: 1265-1280.

- Siegel CS, Fink KL, Strittmatter SM, Cafferty WB. 2015. Plasticity of intact rubral projections mediates spontaneous recovery of function after corticospinal tract injury. *J Neurosci* 35: 1443-1457.
- Silva-Hucha S, Hernández RG, Benítez-Temiño B, Pastor AM, de la Cruz RR, Morcuende S. 2017. Extraocular motoneurons of the adult rat show higher levels of vascular endothelial growth factor and its receptor. *PLoS ONE* 12: e0178616.
- Simons B, Büttner U. 1985. The influence of age on optokinetic nystagmus. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 234: 369-373.
- Simpson JI, Giolli RA, Blanks RH. 1988. The pretectal nuclear complex and the accessory optic system. *Rev Oculomot Res* 2: 335-364.
- Simpson JI, Graf W. 1981. Eye-muscle geometry and compensatory eye movements in lateral-eyed and frontal-eyed animals. *Ann NY Acad Sci* 374: 20-30.
- Skaper SD. 2012. The neurotrophin family of neurotrophic factor: an overview. *Methods in Mol Bio* 846: 1-12.
- Sloviter RS. 1994. The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 35: 640-654.
- Smith PF, Zheng Y. 2013. Principal component analysis suggests subtle changes in glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus following bilateral vestibular deafferentation. *Neurosci Lett* 548: 265-268.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. 2001. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24: 1217-1281.
- Sofroniew MV, Isacson O. 1988. Distribution of degeneration of cholinergic neurons in the septum following axotomy in different portions of the fimbria-fornix: a correlation between degree of cell loss and proximity of neuronal somata to the lesion. *J Chem Neuroanat* 1: 327-337.
- Sorensen SA, Rubel EW. 2006. The level and integrity of synaptic input regulates dendrite structure. *J Neurosci* 26: 1539-1550.
- Spencer RF, Evinger C, Baker R. 1982. Electron microscopic observations of axon collateral synaptic endings of cat oculomotor motoneurons stained by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Res* 234: 423-429.
- Spencer RF, Porter JD. 2006. Biological organization of the extraocular muscles. En: *Neuroanatomy of the Oculomotor System, Progress in Brain Research*, vol. 151 (Büttner-Ennever JA, ed) pp. 43-80. Amsterdam: Elsevier.
- Spencer RF, Sterling P. 1977. An electron microscope study of motoneurons and interneurons in the cat abducens nucleus identified by retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 176: 65-85.
- Spencer RF, Wenthold RJ, Baker R. 1989. Evidence for glycine as an inhibitory neurotransmitter of vestibular, reticular, and prepositus hypoglossi neurons that project to the cat abducens nucleus. *J Neurosci* 9: 2718-2736.

- Stahl JS, Simpson JL. 1995. Dynamics of abducens nucleus neurons in the awake rabbit. *J Neurophysiol* 73: 1383-1395.
- Steiger HJ, Büttner-Ennever JA. 1978. Relationship between motoneurons and internuclear neurons in the abducens nucleus: A double retrograde tracer study in the cat. *Brain Res* 148: 181-188.
- Steljes TP, Kinoshita Y, Wheeler EF, Oppenheim RW, von Bartheld CS. 1999. Neurotrophic factor regulation of developing avian oculomotor neurons: differential effects of BDNF and GDNF. *J Neurobiol* 41: 295-315.
- Steward O, Vinsant SL, Davis L. 1988. The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: an ultrastructural study of changes in presynaptic terminals as a result of sprouting. *J Comp Neurol* 267: 203-210.
- Stowe AM, Plautz EJ, Eisner-Janowicz I, Frost SB, Barbay S, Zoubina EV, Dancause N, Taylor MD, Nudo R. 2005. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 76-85.
- Stowe AM, Plautz EJ, Eisner-Janowicz I, Frost SB, Barbay S, Zoubina EV, Dancause N, Taylor MD, Nudo RJ. 2007. VEGF protein associates to neurons in remote regions following cortical infarct. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 76-85.
- Straka H, Dieringer N. 2004. Basic organization principles of the VOR: lessons from frogs. *Prog Neurobiol* 73: 259-309.
- Strassman A, Highstein SM, McCrea RA. 1986a. Anatomy and physiology of saccadic burst neurons in the alert squirrel monkey. I. Excitatory burst neurons. *J Comp Neurol* 249: 337-357.
- Strassman A, Highstein SM, McCrea RA. 1986b. Anatomy and physiology of saccadic burst neurons in the alert squirrel monkey. II. Inhibitory burst neurons. *J Comp Neurol* 249: 358-380.
- Sugihara I, Lohof AM, Letellier M, Mariani J, Sherrard RM. 2003. Post-lesion transcommissural growth of olivary climbing fibres creates functional synaptic microzones. *Eur J Neurosci* 18: 3027-3036.
- Sumner BE. 1975. An ultrastructural study of normal and injured hypoglossal nuclei after injection of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 23: 463-470.

T

- Tailby C, Wright LL, Metha AB, Calford MB. 2005. Activity-dependent maintenance and growth of dendrites in adult cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4631-4636.
- Takemoto T, Ishihara Y, Ishida A, Yamazaki T. 2015. Neuroprotection elicited by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor released from astrocytes in response to methylmercury. *Environ Toxicol Pharmacol* 40: 199-205.
- Tanaka S, Sekino Y, Shirao T. 2000. The effects of neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor on cerebellar granule cell movement and neurite extension in vitro. *Neuroscience* 97: 727-734.
- Tang S, Machaalani R, Waters KA. 2010. Immunolocalization of pro- and mature-brain derived neurotrophic factor (BDNF) and receptor TrkB in the human brainstem and hippocampus. *Brain Res* 1354: 1-14.

- Terauchi A, Johnson-Venkatesh EM, Toth AB, Javed D, Sutton MA, Umemori H. 2010. Distinct FGFs promote differentiation of excitatory and inhibitory synapses. *Nature* 465: 783-788.
- Thanos S, Mey J. 1995. Type-specific stabilization and target-dependent survival of regenerating ganglion cells in the retina of adult rats. *J Neurosci* 15: 1057-1079.
- Thier P, Ilg UP. 2005. The neural basis of smooth-pursuit eye movements. *Curr Opin Neurobiol* 15: 1-8.
- Thomas L, Hartung K, Langosch D, Rehm H, Bamberg E, Franke WW, Betz H. 1988. Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science* 242: 1050-1053.
- Tillo M, Ruhrberg C, Mackenzie F. 2012. Emerging roles for semaphorins and VEGFs in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Cell Adh Migr* 6: 541-546.
- Toledo-Aral JJ, Méndez-Ferrer S, Pardal R, Echevarría M, López-Barneo J. 2003. Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J Neurosci* 23: 141-148.
- Tonra JR, Curtis R, Wong V, Cliffer KD, Park JS, Timmes A, Nguyen T, Lindsay RM, Acheson A, DiStefano PS. 1998. Axotomy upregulates the anterograde transport and expression of brain-derived neurotrophic factor by sensory neurons. *J Neurosci* 18: 4374-4383.
- Tovar-Y-Romo LB, Ramírez-Jarquín UN, Lazo-Gómez R, Tapia R. 2014. Trophic factors as modulators of motor neuron physiology and survival: implications for ALS therapy. *Front Cell Neurosci* 8: 61.
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K. 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420: 788-794.
- Tropea D, Caleo M, Maffei L. 2003. Synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and chondroitinase ABC on retinal fiber sprouting after denervation of the superior colliculus in adult rats. *J Neurosci* 23: 7034-7044.
- Tsukahara N. 1981. Synaptic plasticity in the Mammalian central nervous system. *Ann Rev Neurosci* 4: 351-379.
- Turrigiano, GG. 1999. Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci* 22: 221-227.
- Turrigiano GG. 2012. Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a00573.
- Turrigiano GG, Nelson SB. 2000. Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10: 358-364.
- Turrigiano GG, Nelson SB. 2004. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5: 97-107.
- Tuszynski MH, Mafong E, Meyer S. 1996. Central infusions of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5, but not nerve growth factor and neurotrophin-3, prevent loss of the cholinergic phenotype in injured adult motor neurons. *Neuroscience* 71: 761-771.

- Tuttle R, O'Leary DD. 1998. Neurotrophins rapidly modulate growth cone response to the axon guidance molecule, collapsin-1. *Mol Cell Neurosci* 11: 1-8.
- Tyler WJ, Perret SP, Pozzo-Miller LD. 2002. The role of neurotrophins in neurotransmitter release. *Neuroscientist* 8: 524-31.

U

- Ugolini G, Klam F, Doldan Dans M, Dubayle D, Brandi AM, Büttner-Ennever JA, Graf W. 2006. Horizontal eye movement networks in primates as revealed by retrograde transneuronal transfer of rabies virus: differences in monosynaptic input to "slow" and "fast" abducens motoneurons. *J Comp Neurol* 498: 762-785.

V

- van der Zee CEEM, Fawcett J, Diamond J. 1992. Antibody to NGF inhibits collateral sprouting of septohippocampal fibers following entorhinal cortex lesion in adult rats. *J Comp Neurol* 326: 91-100.
- van Leeuwen AF, Collewiin H, Erkelens CJ. 1998. Dynamics of horizontal vergence movements: interaction with horizontal and vertical saccades and relation with monocular preferences. *Vision Res* 38: 3943-3954.
- van Meer MP, Otte WM, van der Marel K, Nijboer CH, Kavelaars A, van der Sprenkel JW, Viergever MA, Dijkhuizen RM. 2012. Extent of bilateral neuronal network reorganization and functional recovery in relation to stroke severity. *J Neurosci* 32: 4495-4507.
- Varon SS, Conner JM, Kuang RZ. 1995. Neurotrophic factors: repair and regeneration in the central nervous system. *Rest Neurol Neurosci* 8: 85-94.
- Vlachos A, Ikenberg B, Lenz M, Becker D, Reifenberg K, Bas-Orth C, Deller T. 2013. Synaptopodin regulates denervation-induced homeostatic synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 8242-8247.
- von Bartheld CS, Byers MR, Williams R, Bothwell M. 1996. Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature* 379: 830-833.
- von Bartheld CS, Wang X, Butowt R. 2001. Anterograde axonal transport, transcytosis, and recycling of neurotrophic factors: the concept of trophic currencies in neural networks. *Mol Neurobiol* 24: 1-28.

W

- Walmsley B, Alvarez FJ, Fyffe RE. 1998. Diversity of structure and function at mammalian central synapses. *Trends Neurosci* 21: 81-88.
- Wang Y, Rubel EW. 2012. *In vivo* reversible regulation of dendritic patterning by afferent input in bipolar auditory neurons. *J Neurosci* 32: 11495-11504.
- Wang W, Salvaterra PM, Loera S, Chiu AY. 1997. Brain-derived neurotrophic factor spares choline acetyltransferase mRNA following axotomy of motor neurons in vivo. *J Neurosci Res* 1997 47: 134-143.

- Watson FL, Heerssen HM, Moheban DB, Lin MZ, Sauvageot CM, Bhattacharyya A, Pomeroy SL, Segal RA. 1999. Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex. *J Neurosci* 19: 7889-7900.
- Webber CA, Xu Y, Vanneste KJ, Martinez JA, Verge VM, Zochodne DW. 2008. Guiding adult Mammalian sensory axons during regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 67: 212-222.
- Wefelmeyer W, Cattaert D, Burrone J. 2015. Activity-dependent mismatch between axo-axonic synapses and the axon initial segment controls neuronal output. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 9757-9762.
- Wentzel PR, De Zeeuw CI, Holstege JC, Gerrits NM. 1993. Colocalization of GABA and glycine in the rabbit oculomotor nucleus. *Neurosci Lett* 164: 25-29.
- Wentzel PR, Gerrits NM, de Zeeuw CI. 1996. GABAergic and glycinergic inputs to the rabbit oculomotor nucleus with special emphasis on the medial rectus subdivision. *Brain Res* 707: 314-319.
- Westlake KP, Byl NN. 2013. Neural plasticity and implications for hand rehabilitation after neurological insult. *J Hand Ther* 26: 87-93.
- Widenfalk J, Lundströmer K, Jubran M, Brene S, Olson L. 2001. Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid. *J Neurosci* 21: 3457-3475.
- Wolff JR, Eins S, Holzgraefe M, Záborszky L. 1981. The temporo-spatial course of degeneration after cutting cortico-cortical connections in adult rats. *Cell Tissue Res* 214: 303-21.
- Woolf CJ, Mannion, RJ. 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353: 1959-1964.

Y

- Yamahachi H, Marik SA, McManus JN, Denk W, Gilbert CD. 2009. Rapid axonal sprouting and pruning accompany functional reorganization in primary visual cortex. *Neuron* 64: 719-729.
- Yamuy J, Pose I, Pedroarena C, Morales FR, Chase MH. 2000. Neurotrophin-induced rapid enhancement of membrane potential oscillations in mesencephalic trigeminal neurons. *Neuroscience* 95: 1089-1100.
- Yan Q, Matheson C, Lopez OT, Miller JA. 1994. The biological responses of axotomized adult motoneurons to brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 14: 5281-5291.
- Ye JH, Houle JD. 1997. Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. *Exp Neurol* 143: 70-81.
- Yoon SO, Casaccia-Bonofil P, Carter B, Chao MV. 1998. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 18: 3273-3281.

Z

- Zafra F, Castrén E, Thoenen H, Lindholm D. 1991. Interplay between glutamate and γ -aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10037-10041.
- Zhang B, Goldberger ME, Wu LF, Murray M. 1995. Plasticity of complex terminals in lamina II in partially deafferented spinal cord: the cat spared root preparation. *Exp Neurol* 132: 186-193.
- Zhang G, Gao Z, Guan S, Zhu Y, Wang JH. 2013. Upregulation of excitatory neurons and downregulation of inhibitory neurons in barrel cortex are associated with loss of whisker inputs. *Mol Brain* 6: 2.
- Zhang H, Gamlin PD. 1998. Neurons in the posterior interposed nucleus of the cerebellum related to vergence and accommodation. I. Steady-state characteristics. *J Neurophysiol* 79: 1255-1269.
- Zhang Y, Bo X, Schoepfer R, Holtmaat AJ, Verhaagen J, Emson PC, Lieberman AR, Anderson PN. 2005. Growth-associated protein GAP-43 and L1 act synergistically to promote regenerative growth of Purkinje cell axons in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 14883-14888.
- Zhang Y, Gamlin PD, Mays LE. 1991. Antidromic identification of midbrain near response cells projecting to the oculomotor nucleus. *Exp Brain Res* 84: 525-528.
- Zhang Y, Mays LE, Gamlin PD. 1992. Characteristics of near response cells projecting to the oculomotor nucleus. *J Neurophysiol* 67: 944-960.
- Zhang YH, Kays J, Hodgdon KE, Sacktor TC, Nicol GD. 2012. Nerve growth factor enhances the excitability of rat sensory neurons through activation of the atypical protein kinase C isoform, PKM ζ . *J Neurophysiol* 107: 315-335.
- Zhang Y, Xiong Y, Mahmood A, Meng Y, Liu Z, Qu C, Chopp M. 2010. Sprouting of corticospinal tract axons from the contralateral hemisphere into the denervated side of the spinal cord is associated with functional recovery in adult rat after traumatic brain injury and erythropoietin treatment. *Brain Res* 1353: 249-257.
- Zhou X, Yang JW, Zhang W, Ou KQ, Zhou HL, Ma YQ, Chen SX, Li LY, Wang TH. 2009. Role of NGF in spared DRG following partial dorsal rhizotomy in cats. *Neuropeptides* 43: 363-369.
- Zimmermann L, Morado-Díaz CJ, Davis-López de Carrizosa MA, de la Cruz RR, May PJ, Streicher J, Pastor AM, Blumer R. 2013. Axons giving rise to the palisade endings of feline extraocular muscles display motor features. *J Neurosci* 33: 2784-2793.
- Zörner B, Bachmann LC, Filli L, Kapitza S, Gullo M, Bolliger M, Starkey ML, Röthlisberger M, Gonzenbach RR, Schwab ME. 2014. Chasing central nervous system plasticity: the brainstem's contribution to locomotor recovery in rats with spinal cord injury. *Brain* 137: 1716-1732.